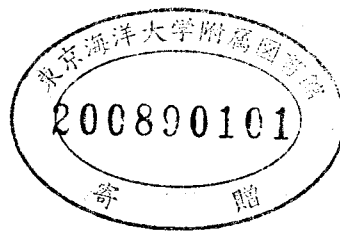


## 果実の葉エキス成分の血糖値上昇抑制作用

著者	城? 美幸
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2007
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1342/00000902/">http://id.nii.ac.jp/1342/00000902/</a>

修士学位論文

果実の葉エキス成分の血糖値上昇抑制作用



平成 19 年度

( 2008 年 3 月 )

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

食機能保全科学専攻

城崎 美幸

## 目次

### 第1章 序論

1・1 はじめに	1
1・2 糖質代謝	3
1・3 インスリン抵抗性と糖尿病	6
1・4 糖尿病の分類	7
1・5 糖尿病の現状	8
1・6 糖尿病の予防	9
1・7 糖尿病の成因と病態	10
1・8 糖尿病の診断	11
1・9 糖尿病急性合併症	12
1・10 糖尿病慢性合併症	13
1・10・1 糖尿病網膜症	13
1・10・2 糖尿病腎症	13
1・10・3 糖尿病神経障害	14
1・11 糖尿病の治療と予防	14
1・11・1 インスリン療法	16
1・11・2 インスリン分泌促進薬	16
1・11・2・1 スルホニル尿素薬	16
1・11・2・2 フェニルアラニン誘導体	16
1・11・3 インスリン抵抗性改善薬	17
1・11・3・1 チアゾリジン誘導体	17
1・11・3・2 ビクアナイト薬	17
1・11・4 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬	17
1・12 食品機能による糖尿病予防	18
1・13 本研究の目的	20

### 第2章 実験方法

2・1 試薬	21
2・2 実験動物	21
2・3 サンプルの調製	21
2・4 マウスを用いた糖負荷試験	22
2・5 糖質分解酵素阻害活性試験	22
2・5・1 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験	22
2・5・2 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性試験	23
2・6 マウス腸管におけるグルコースの吸収阻害試験	24
2・7 糖尿病モデルマウスを用いた長期試験	25

2・7・1 飼料組成	25
2・7・2 ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウスを用いた糖尿病発症予防試験	26
2・7・3 ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウスにおける糖尿病改善試験	27
2・8 マウスを用いた脂質負荷試験	28
2・9 統計処理	28
2・10 分離・精製の操作	29
2・11 機器分析	30

### 第3章 血糖値上昇抑制作用を有する新規食品素材の探索

3・1 一次スクリーニング	31
3・2 血糖値上昇抑制作用を有する果樹の葉のスクリーニング	31

### 第4章 キウイ葉エキスの血糖値上昇抑制作用

4・1 キウイフルーツとは	33
4・2 キウイフルーツ葉エキスの調製	33
4・3 マウスを用いた各種糖質負荷試験におけるキウイ葉エキスの血糖値上昇抑制作用	34
4・4 キウイ葉エキスの糖質分解酵素阻害活性	36
4・5 血糖値上昇抑制作用を有する既存商品との比較	37
4・6 用量依存性の確認	38
4・7 抽出溶媒による検討	39
4・8 キウイエキス抽出部位による比較	40
4・9 近縁種の血糖値上昇抑制作用	43
4・10 キウイ枯葉エキスの血糖値上昇抑制作用	45
4・11 キウイ葉エキスの活性成分の分離①	46
4・12 キウイ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用	46
4・13 キウイ葉エキス画分の <i>in vitro</i> 試験における酵素阻害活性	48
4・14 キウイ葉エキスの活性成分の分離②	49
4・14・1 キウイ葉エキスの $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分の分離①	49
4・14・2 キウイ葉エキスのスクラーゼ阻害活性成分の分離②	51
4・15 キウイ葉エキスの活性成分の構造解析	53
4・15・1 キウイ葉エキスの $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分	53
4・15・2 キウイ葉エキスのスクラーゼ阻害活性成分	53
4・16 キウイ葉エキスのコレステロール上昇抑制作用	54
4・17 キウイ葉エキスのトリグリセリド上昇抑制作用	55
4・18 まとめ	56



第5章	モモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用	
5・1	モモとは	57
5・2	モモ葉エキスの調製	57
5・3	マウスを用いた各種糖質負荷試験におけるモモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用	58
5・4	モモ葉エキスの糖質分解酵素阻害活性	60
5・5	モモ葉エキスの腸管におけるグルコース吸収阻害作用	61
5・6	血糖値上昇抑制作用を有する既存商品との比較	62
5・7	用量依存性の確認	63
5・8	抽出溶媒による検討	64
5・9	乾燥温度による検討	65
5・10	品種の異なるモモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用	67
5・11	モモエキスの抽出部位による比較	68
5・12	近縁種の血糖値上昇抑制作用	69
5・13	近縁種の抽出部位による比較	71
5・14	モモ葉エキスの活性成分の分離①	74
5・15	モモ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用①	74
5・16	モモ葉エキスの活性成分の分離②	76
5・17	モモ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用②	77
5・18	モモ葉エキス画分の <i>in vitro</i> 試験における糖質分解酵素阻害活性	78
5・19	モモ葉エキスの活性成分の分離③	79
5・19・1	モモ葉エキスの $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分の分離	79
5・19・2	モモ葉エキスの腸管におけるグルコース吸収阻害活性成分の分離	80
5・20	モモ葉エキスの活性成分の構造解析	82
5・20・1	モモ葉エキスの $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分	82
5・20・2	モモ葉エキスの腸管におけるグルコース吸収阻害活性成分	83
5・21	糖尿病モデルマウスを用いた長期試験	85
5・21・1	ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウスを用いた糖尿病発症予防作用	85
5・21・2	ストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルマウスにおける糖尿病改善作用	89
5・22	モモ葉エキスのコレステロール上昇抑制作用	89
5・23	モモ葉エキスのトリグリセリド上昇抑制作用	93
5・24	まとめ	94
第6章	総括	96
	謝辞	98
	参考文献	99
	添付資料	103

## 第1章 序 論

### 1・1 はじめに

平成17年の厚生労働省の統計によると、日本人の死因の第1位は、悪性新生物（がん）32万5885人、第2位は心疾患（心臓病）17万3026人、第3位は脳血管疾患（脳卒中）13万2799人である<sup>1)</sup>。これら3つの疾患は以前は加齢によって発病すると考えられていたために、「成人病」と呼ばれていたが、現在は生活習慣の乱れから起こるいわゆる「生活習慣病」と呼ばれている。心臓病、脳卒中を引き起こす原因の動脈硬化の他に、生活習慣病とされるものには、高血圧症、高脂血症、糖尿病、心筋梗塞などがあるが、いずれも加齢によるものや遺伝的な要因と共に、食事、睡眠といった生活リズムの乱れ、運動不足、喫煙、飲酒、過労、ストレスなどが大きな要因とされている。その原因として、近年における生活のオートメーション化による日常生活上での運動量の低下、食の欧米化に伴う栄養バランスの悪い食生活や高カロリーの食事が挙げられる。さらには精神的なストレスの増大も疾患の発症要因となっている。最近の研究では、様々な生活習慣病には、脂肪組織（内臓脂肪）が深く関わっているということがわかってきた<sup>2)</sup>。つまり、この内臓脂肪が原因の肥満（内臓脂肪型肥満）は、生活習慣病に罹患しやすい状態であるということになり、その状態を指す「メタボリックシンドローム」という言葉が注目されるようになった。「メタボリックシンドローム」の定義は、「過食や運動不足によって内臓脂肪が蓄積し、複数の生活習慣病を合併（重複存在）する状態」とされている。ここで挙げられている生活習慣病名には、高血圧症、高脂血症（コレステロールやトリグリセリドの高値）、糖尿病（インスリン抵抗性）を含み、これらは動脈硬化発症の危険因子とされているものでもある。2004年4月に発足したメタボリックシンドローム診断基準検討委員会では、この言葉を「耐糖能異常、高脂血症、高血圧を合併する動脈硬化易発症状態」と定義している。

近年、生活習慣と健康との関連性が取り上げられるようになってきた背景から、一度悪くなってしまった病気を治す「治療医学」よりも、病気になる時期を遅らせる「予防医学」が重要視され始めてきた。特に「食」は「医食同源」という言葉が存在するように極めて重要な要因であることが明らかで、食事による影響が大きくヒトの健康を左右するため、予防医学的な「知的生活習慣」、その中でも「知的食生活」の実行によって、生活習慣病の進行を抑制したり、予防して発症を遅らせることで「健康寿命」をまっとうすることができると考えられる。ここでいう健康寿命とは、世界保健機構（WHO）の報告による「健やかに過ごせる人生の長さ」である。しかしながら、現在の日本における欧米型食生活、ファーストフード、インスタント食品や社会的ストレスによって食生活は偏り、そのため悪い食習慣、あるいは食品の安全性に対する不安を全て避けて通ることは不可能である。従って死亡原因をすべて受け入れないようにするという除去予防で

はなく、現在の偏ってしまった食生活に何かプラスアルファし、死亡時期を遅らせるという化学予防を実践するという知的食生活が必要である。その知的食生活を実践するために必要なものがヘルスフードである。ヘルスフードとは食品の第三次機能に注目した機能性食品のことをいい、食生活の偏りが大きい現代において六大栄養素（脂質、糖質、タンパク質、ビタミン、ミネラル、食物繊維）だけでは健康を維持することが困難なため、食生活の偏りを正す手助けとなるプラスアルファの栄養素である。ヘルスフードの機能として、人の体・脳・心の健康に障害となるものに対応することがその機能になる。例えば、生活習慣病や痴呆症、感染症、ストレスなどに対応する予防医学食品や特定保健用食品、さらに生活の質(QOL)を向上、または改善する食品、あるいは健康の問題ばかりでなく美容向上のための美容食品など多岐にわたるヘルスフードがある。ヘルスフードの要件としては、①有効性が科学的に証明されている、薬理的にヒト臨床で有意差があること、②安全性が確保されており、できれば食経験があること、③作用機序が解明または推定可能であること、この3点が十分に確保されていることが必須条件と考え、これらを立証する学問を「ヘルスフード科学」という<sup>3,4)</sup>。生活習慣病である高血圧症、高脂血症、糖尿病、肥満は自覚症状が無いため、これらの病気に関わる半病人または半健康人と考えられる人は医薬品を摂取するのではなく、食品で予防・改善したいと考えることが多い。しかし、これらの健康機能を有する食品を摂取しようとしても、栄養素または食品成分が持つ身体の構造および機能に及ぼす効果を表示することは薬事法で制限されており、国民の知る権利を満たすことができない状況が生じてきた。先に述べた特定保健用食品とは、食品機能を有する食品の成分全般を広く関与成分の対象として、ある一定の科学的根拠を有することが認められたものについて、厚生労働大臣の許可を得て特定の保健の用途に適する旨を表示した食品である。その健康強調表示（health claim：健康に関する機能表示）に関わる有効成分の取り扱いから、「個別許可型」、「規格基準型」、「条件付き特定保健用食品」があり、有効性及び安全性について、基本的に厚生労働省及び食品安全委員会の審査が必要とされる。平成19年12月4日現在、752品目が特定保健用食品として許可（承認）されている。「保健の用途（健康に関する機能表示）」別にみると、乳酸菌・食物繊維・オリゴ糖を関与成分（保健の用途に直接関与する成分）とする「整腸関連」の品目が60%弱と最も多く、次いでコレステロール関連（10%）、血圧関連（8%）、血糖値関連（6%）が続いている。他にミネラル（カルシウム、鉄、マグネシウム）の吸収促進、虫歯関連、骨関連の表示が許可されている。このうち、糖尿病に最も関連のある「血糖値が気になる方へ」の商品は31品目である。

血糖値とは、血液1 dl中のグルコースのmgで表され、人での血糖値の正常値はおおよそ100 であり、食前・食後でその値は70 から120 の間を変動する。グルコースは生体に最も重要なエネルギー源であるグルコースの生成に重要な糖質の代謝について説明する。

## 1・2 糖質代謝

糖質が分解される主要な場所は、口と腸管腔である。食事の主要な多糖は動物由来のグリコーゲンと植物由来のデンプンである。デンプンは $\alpha$ -1,4結合したD-グルコースからなるアミロースと、グルコース残基の6位に枝分かれをもつアミロペクチンから構成されている。私たちが普段摂取している糖質はいくつかの分解酵素によって単糖類に分解されてから、小腸粘膜から吸収され体内でエネルギーとして利用されている。まず、口から摂取したデンプンは咀嚼している間に、唾液中の $\alpha$ -アミラーゼがランダムに短時間作用して、ある程度 $\alpha$ -1,4結合を分解する。胃では、高い酸性のために唾液由来の $\alpha$ -アミラーゼが不活性化されるため、糖質の分解は胃の中では一時停止する。酸性の胃内容物が小腸に到着すると、膵臓によって分泌された重炭酸により中和され、膵液に分布する $\alpha$ -アミラーゼによってデンプンはオリゴ糖や二糖類であるマルトースに分解される。最終的な分解は、小腸粘膜に存在する $\alpha$ -グルコシダーゼ（ $\alpha$ -グルコシド結合を加水分解する酵素の総称）によって上部小腸の粘膜細胞でおこる。マルターゼはマルトースを分解し、グルコースを生じる。スクラーゼはスクロースを分解し、グルコースとフルクトースを生じる。 $\alpha$ -グルコシダーゼは小腸粘膜細胞の刷子縁膜の管腔側を通過して分泌され、細胞膜上に結合して留まる。十二指腸と上部空腸が食事の糖の大部分を吸収する。各々の単糖類は異なる機構で吸収される。グルコースは細胞内に拡散で入ることはできないが、 $\text{Na}^+$ -非依存性促進拡散輸送系か $\text{Na}^+$ -単糖共輸送系のいずれかにより、細胞内に入ることができる。

### (a) $\text{Na}^+$ -非依存性促進拡散輸送系

この系は細胞膜に存在する少なくとも14種のグルコース輸送体(GLUT)のファミリーによって媒介される。これらの輸送体は細胞膜中で2つの立体配座を取り、細胞外のグルコースが輸送体に結合し、その配座を変化させることによりグルコースは細胞膜を乗り越えて細胞内へと輸送される。

### (b) $\text{Na}^+$ -単糖共輸送系

この系はグルコースを濃度勾配に逆らって輸送するエネルギー依存性過程である。グルコースの移動が $\text{Na}^+$ の濃度交配に共役している担体依存性過程であり、グルコースと同時に $\text{Na}^+$ も細胞内に輸送される。このタイプの輸送は腸・腎尿細管の上皮細胞でも起こる。

グルコースは、ナトリウムイオンの共輸送を伴う能動的なエネルギー依存性のグルコーストランスポーターにより粘膜細胞内に輸送される。フルクトースの取り込みは $\text{Na}^+$ -非依存性促進拡散輸送系であるGLUT5によって行われる。これらの単糖類の小腸粘膜細胞から門脈循環系への輸

送はまた別のトランスポーターで $\text{Na}^+$  - 非依存性促進拡散輸送系であるGLUT 2 によって行われる。血液中に吸収されたグルコースは門脈内に流入し一部は肝臓に取り込まれ、肝臓を通り抜けたグルコースは末梢血中で血糖値を上昇させる(Fig.1)。

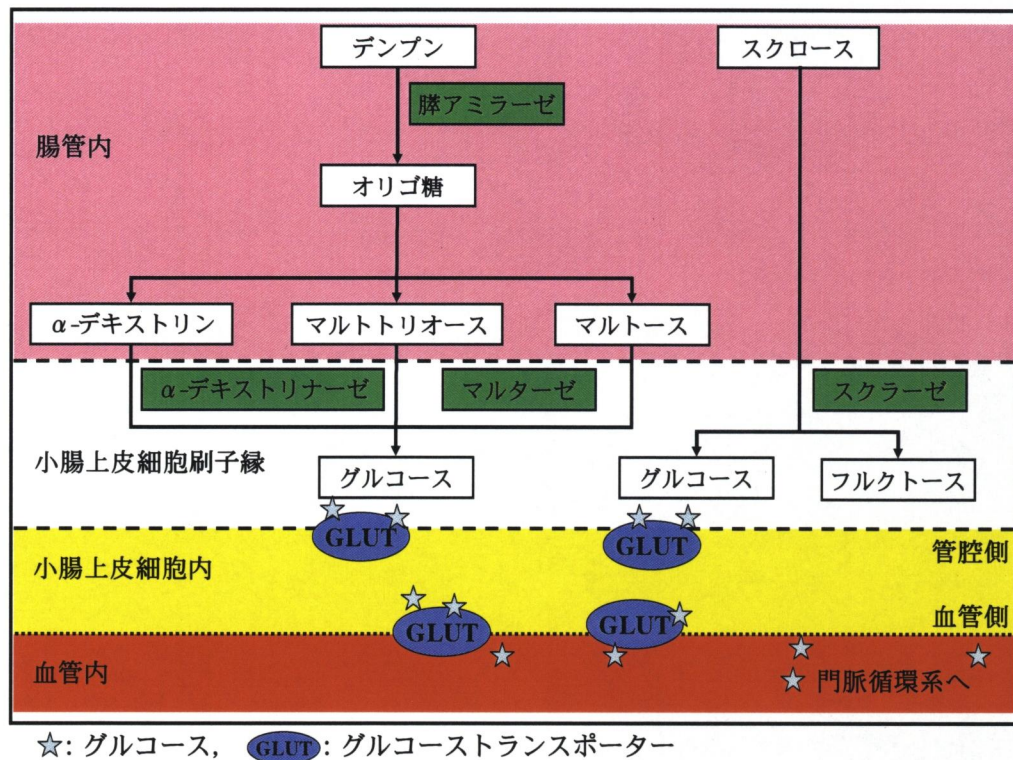


Fig. 1 消化管における糖質の分解と体内への吸収の概要<sup>5)</sup>

血糖値の上昇により膵臓ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞にGLUT 2 ( $\text{Na}^+$  - 性促進拡散輸送系) を介してグルコースが流入する。細胞内に流入したグルコースは、解糖系やTCA回路で代謝され、この結果ATPが産生される。通常、細胞内は $\text{K}^+$ チャンネルからの $\text{K}^+$ の流出により負に帯電しているが、産生されたATPがこの $\text{K}^+$ チャンネルを閉鎖するため細胞内に $\text{K}^+$ が蓄積し、次第に正に帯電してくる。この結果、細胞膜の脱分極が起こりその刺激で $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルが開き、細胞内へ流入した $\text{Ca}^{2+}$ により $\text{Ca}^{2+}$ が生じる。 $\text{Ca}^{2+}$ 電流の刺激により分泌顆粒内のインスリンが血中へ開口分泌される。血中に分泌されたインスリンは標的器官である肝臓、骨格筋や脂肪細胞の細胞膜上のインスリン受容体に結合する。インスリンの結合により、受容体はリン酸化され、細胞内のインスリン受容体基質IRSのリン酸化など、細胞シグナル伝達のカスケードが開始される。活性化した受容体は細胞内プールから細胞膜表面へGLUT 4の移行を促進させ、GLUT 4を介してグルコースが標的器官の細胞内に取り込まれる。取り込まれたグルコースは蓄えられたり、活動エネルギーとして利用され、血糖値は速やかに正常の血糖値にもどる。インスリン濃度が低下すると、GLUT 4



は再利用のために細胞膜表面から細胞内の貯蔵プールへ小胞ごとと輸送され、エンドソームという細胞小器官と融合し、次の利用までストックされる(Fig.2)。

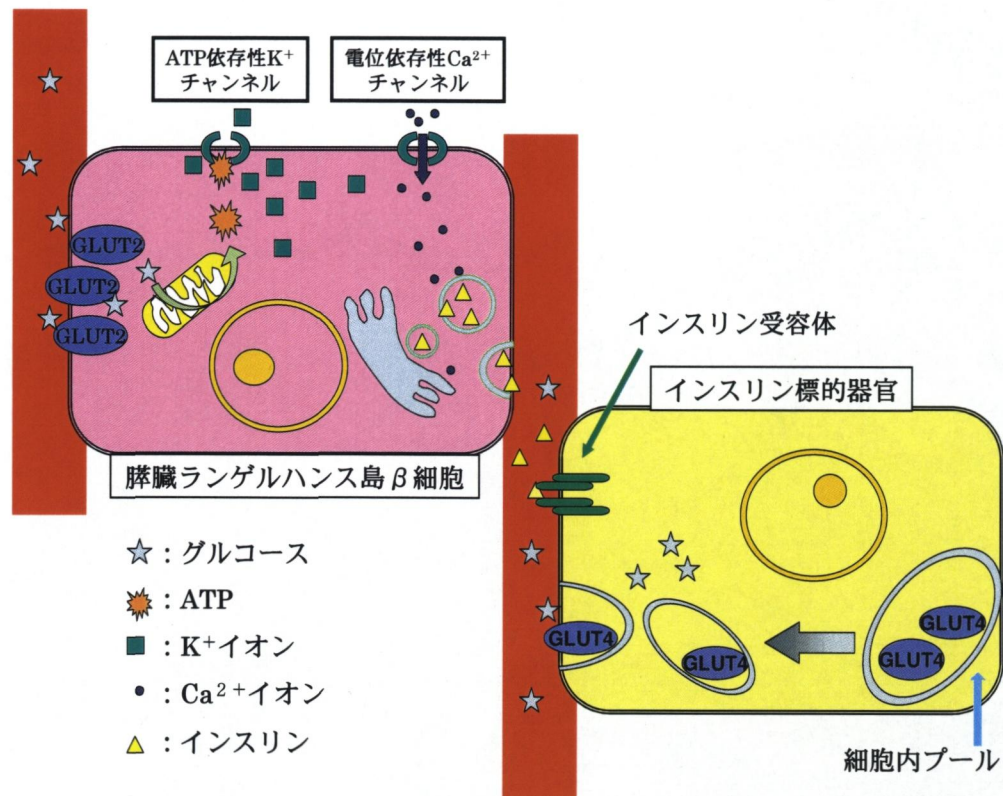


Fig. 2 インスリン分泌と標的器官へのグルコースの取り込み

一方、グルカゴン、副腎皮質ホルモン、カテコールアミンなどのインスリン拮抗ホルモンは、肝臓に貯えられていたグリコーゲンをグルコースに分解したり、肝臓での糖新生を活性化することによって血中へグルコースを放出して血糖値を上昇させる作用を有する。夜寝ている間や食間でも脳や赤血球などで糖代謝が起こっているにもかかわらず低血糖にならない理由は、これらのインスリン拮抗ホルモンの働きのためである。このように血糖値の調整は、インスリン分泌によって制御されている肝糖放出率と、インスリン分泌による細胞での糖吸収率が調和し、さらにインスリン拮抗ホルモンの働きによって血糖値は正常域に保たれている。このように、血糖値はインスリン分泌とそれを受ける標的器官の相互作用によって制御されている。

### 1・3 インスリン抵抗性と糖尿病

標的器官のインスリンの感受性が低下し、インスリンが分泌されてもインスリンの作用が十分に発揮されない状態をインスリン抵抗性という。このインスリン抵抗性の状態では、インスリン作用の発現までの様々な段階のいずれかに異常が生じているため、インスリン刺激によるGLUT4の細胞膜上への移行が低下し、インスリンがあっても細胞内にグルコースが取り込まれにくくなる。このような状態では、次第に食後高血糖を示すようになる（インスリンの相対的不足）。またこれを是正しようと代償性に膵臓からのインスリン分泌が亢進し、高インスリン血症を発症する。食後高血糖の持続は糖毒性を引き起こし、さらに、組織におけるインスリン抵抗性の増大と膵臓の疲弊によるインスリン分泌能の低下を引き起こす。この結果、インスリンによって正常な血糖応答が制御されない状態である耐糖能異常を経て糖尿病の発症に至る<sup>6)</sup>。最近ではインスリン抵抗性が生じる原因の一つとして、内臓脂肪蓄積によるTNF- $\alpha$ の増加やアディポネクチンの低下なども注目されている<sup>7)</sup>。

このように、糖尿病とはインスリン抵抗性やインスリンの分泌不全が生じることで、慢性の高血糖状態となり、様々な病態が引き起こされる疾患である。また、慢性的な高血糖状態が持続すると、糖尿病三大合併症である網膜症、腎症、末梢神経障害等の合併症が発症する。糖尿病の症状および症候には、高血糖によるものと、それに併発した合併症によるものがある。高血糖時に認められる糖尿病の臨床症状として、口渴、多飲、多尿、体重減少がよく知られているが、自覚症状のない時期が長く続くことが多く、高血糖状態を放置することにより、慢性合併症による症状が出現してから初めて気づくことが多い疾患である(Fig.3)。

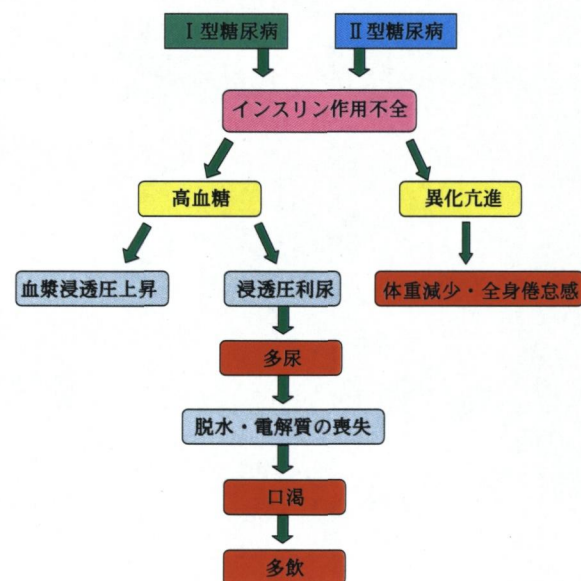


Fig. 3 高血糖時に認められる症状および症候



#### 1・4 糖尿病の分類

糖尿病の基本的症状は持続した高血糖状態である。しかし一概に高血糖といってもその原因はさまざまである。糖尿病の分類と診断の国際標準化を目指して、日本糖尿病学会は2000年に米国糖尿病学会やWHO分類に準じ新しく糖尿病を分類した。糖尿病は大きく分けてⅠ型糖尿病とⅡ型糖尿病に分類することができる(Fig.4)。

分類
1. Ⅰ型糖尿病
A. 自己免疫性
B. 特発性
2. Ⅱ型糖尿病
3. その他の特定の機序、疾患によるもの
A. 遺伝因子として遺伝子異常が同定されたもの
(1) 膵β細胞機能に関わる遺伝子異常
(2) インスリン作用の伝達機構に関わる遺伝子異常
B. 他の疾患、条件に伴うもの
(1) 膵外分泌疾患
(2) 内分泌疾患
(3) 肝疾患
(4) 薬剤や化学物質によるもの
(5) 感染症
(6) 免疫機序によるまれな病態
(7) その他の遺伝子症候群で糖尿病を伴うことが多いもの
4. 妊娠糖尿病

Fig.4 糖尿病の分類

日本人全体の糖尿病患者の5%を占めるⅠ型糖尿病はインスリン依存型とも呼ばれるように、インスリンの分泌不足が原因といわれており、β細胞の破壊消失、免疫異常、遺伝的要因や感染症によるものである。一方、殆どの日本人の糖尿病患者がⅡ型糖尿病でありインスリン非依存型とも呼ばれ全体の95%を占めている。病態としてはインスリン分泌不全とインスリン抵抗性の増加の2因子が考えられる。Ⅱ型糖尿病は栄養過剰、肥満、ストレスといった生活習慣に深くかかわるタイプであり、それに複数の遺伝子素因が関与しあって発症してくると考えられている。若年発症のⅡ型糖尿病である*MODY* (maturity onset diabetes of the young) は従来のⅡ型糖尿病のおよそ5%を占めるが、すでに6種類の原因遺伝子(*MODY1~6*)が同定されている。その他の原因遺伝子としてインスリン遺伝子、インスリン受容体遺伝子、アミリン遺伝子、カルパイン10遺伝子(*NIDDM1~2*)などが上げられる<sup>8)</sup>。

また、妊娠糖尿病は、妊娠中に発症または初めて発見された耐糖能異常で、妊娠前から診断されている糖尿病患者の合併妊娠は含まれない。妊娠糖尿病の診断基準となる血糖値は、胎児へのリスクを考慮して通常の血糖値より低く設定されている。



### 1・5 糖尿病の現状

平成14年度の厚生労働省の糖尿病実態調査によると、「糖尿病が強く疑われる人」は約740万人、「糖尿病の可能性を否定できない人（糖尿病予備軍）」は約880万人である。合計すると約1,620万人であり、これは、日本国民の成人6.3人に1人が糖尿病または糖尿病予備軍ということに相当している。このうち95%をⅡ型糖尿病が占めており、近年におけるⅡ型糖尿病の増加は著しいものがある。その背景として生活環境の急速な欧米化（摂取カロリーの過剰、肥満、運動不足など）があり、人口の高齢化もまたⅡ型糖尿病の増加に拍車をかけている。最近では、肥満児の増加に伴い、小児においても増加している。2010年には有病者が1,080万人に達すると推定されている。

糖尿病は血糖値が上昇するだけでなく、三大合併症をはじめとした細小血管合併症を引き起こし、それが徐々に進行することによってQOLの低下をきたすのみならず、死に直結する難治性の慢性疾患であるため、糖尿病の発症予防は我が国の緊急かつ重要な課題である。また、糖尿病に関する医療費は平成12年度で1兆円を超えており、国民医療費の増大を食い止めるためにも糖尿病予防の重要性が提唱されている。

## 1・6 糖尿病の予防

前述のように糖尿病の現状では特にⅡ型糖尿病が全体の95%を占めており、遺伝要因とともに生活習慣の乱れなどの環境要因が関与してくることがわかっている。さらに、糖尿病は一度発症すると治癒することは困難であり人を死にまで至らしめる合併症を発症する原因となる。健康日本21では、糖尿病の予防について、発症前の段階で生活習慣の中の危険因子を取り除き、発症を予防すること（一次予防）、検診により、すでに発症してしまったⅡ型糖尿病を早期発見し、発症早期から治療を開始する（二次予防）、合併症を発症した場合、治療継続を徹底し、合併症によるQOLの低下や生命予後の悪化を防止する（三次予防）を提唱している<sup>9)</sup>。(Fig.5)

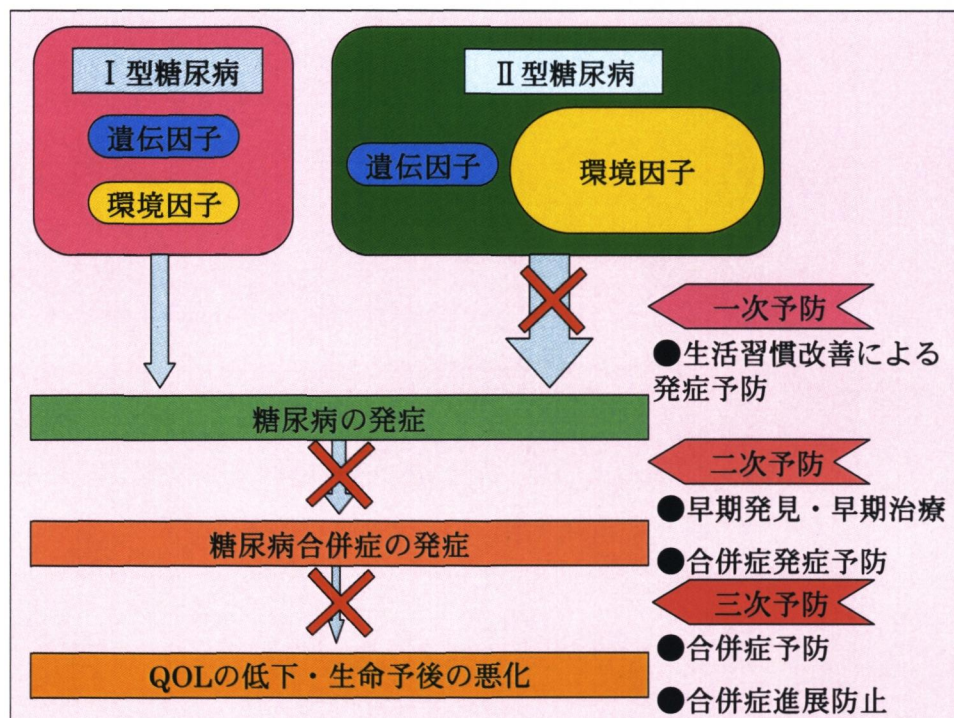


Fig. 5 糖尿病の予防

### 1・7 糖尿病の成因と病態

I型糖尿病は、発症感受性遺伝子（特定のHLA型）をもつ人に、ウイルス感染、化学物質などの環境因子などが引き金となって自己免疫が誘導され、細胞傷害性Tリンパ球により、膵臓β細胞が破壊されることによって発症すると考えられ、多くの場合、最終的にインスリンの完全枯渇（C-ペプチド枯渇）をきたす<sup>10)</sup>。

II型糖尿病は、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性が関与しており、ともに複数の遺伝因子によって規定される。さらに、インスリン抵抗性には、主に生活習慣に起因する環境因子も大きく関与している。生活習慣の乱れには食事、運動、睡眠、ストレスなどが含まれる。食の欧米化によって高脂肪食、高栄養な食事は血中の糖や脂肪を上昇させる。さらに、過剰なエネルギーは運動しても発散されず脂肪細胞に蓄えられ肥満の原因になる。また、睡眠不足や過度のストレスは交感神経を刺激して血糖値を上昇させる作用をもつ。インスリン分泌不全とインスリン抵抗性の関与の程度は症例によって様々である。生体内のインスリンの作用が不足すると高血糖が持続し、糖毒性が生じる。これによりインスリン分泌異常とインスリン抵抗性の増大がいつそう進行する<sup>11)</sup>。(Fig.6)

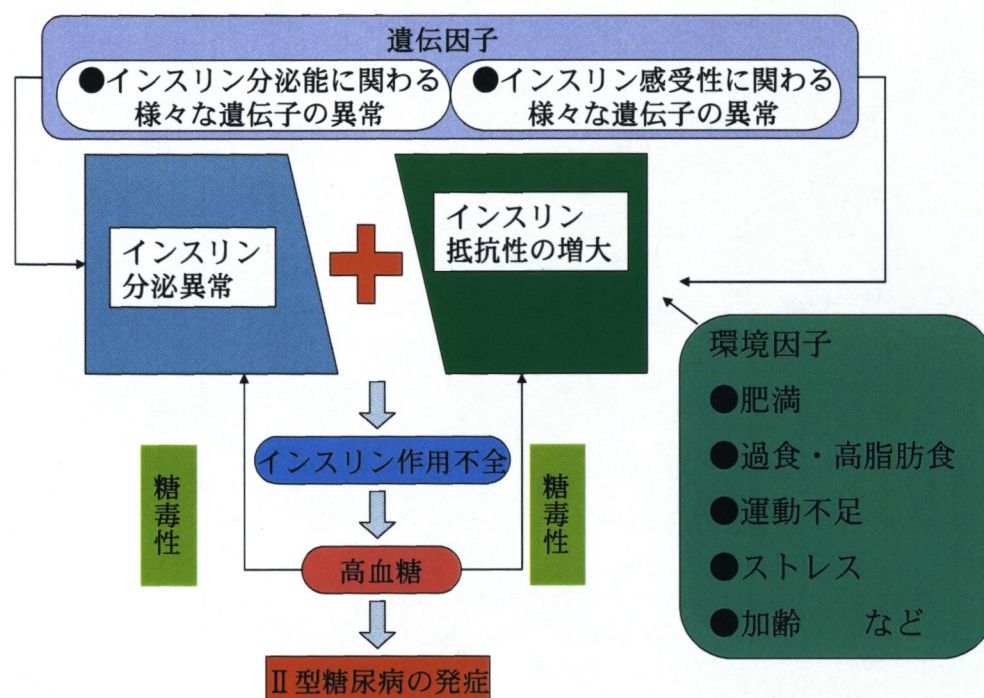


Fig. 6 II型糖尿病の成因

妊娠糖尿病では、妊娠における母体の種々の代謝変化は胎盤を通して胎児に影響を与える。妊娠糖尿病が発症して母体の高血糖状態が持続すると、異常な高濃度のグルコースが胎児の体内に流入し、多彩な発育異常が出現する。胎児へのリスクとして、巨大児、奇形、未熟児などが知られており妊娠糖尿病患者の出産として深刻な問題である<sup>12)</sup>。



## 1・8 糖尿病の診断

健常人の血糖値は恒常的にある一定の範囲で調節されている。しかし何らかの原因でインスリンの分泌や作用が衰えると、上昇した血糖値を正常範囲に調節できなくなることから高血糖状態となる。高血糖状態は糖尿病の基本的症状であり、診断を確定するためには必ず血糖値を測定しなければならない。血糖値による糖尿病の診断は、1999年の日本糖尿病学会の診断基準で、以下のように定義されている (Fig.7)。

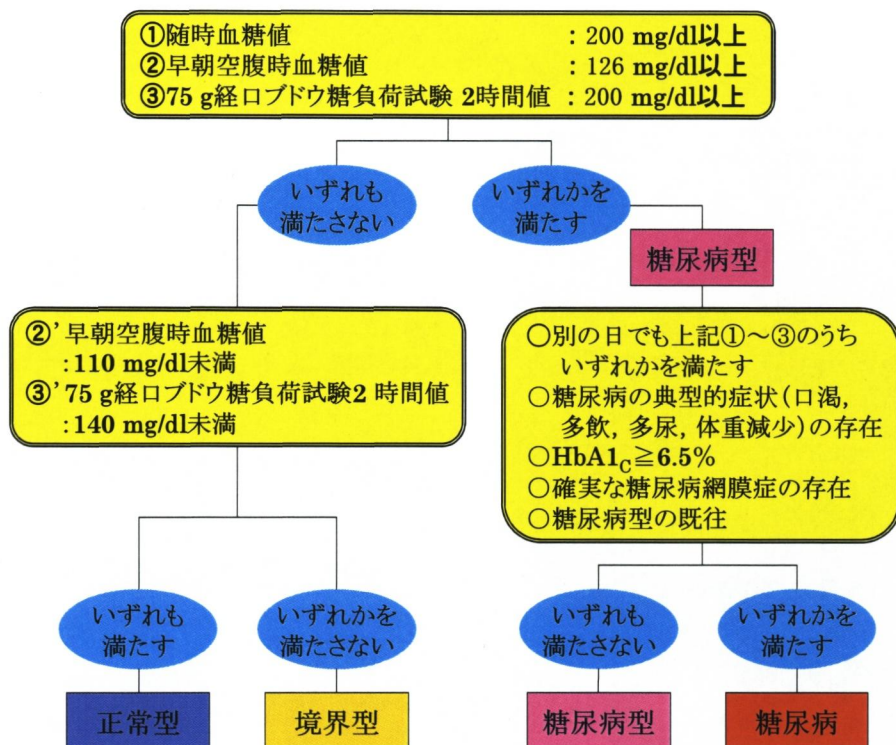


Fig. 7 糖尿病の診断

随時血糖値 $\geq 200$  mg/dl, 早朝空腹時血糖値 $\geq 126$  mg/dl, 75 g経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT<sup>※1</sup>) 2時間値 $\geq 200$  mg/dl, のいずれかが、別の日に行った検査で2回以上確認できれば糖尿病として診断される。これらの基準値を超えても、1回の検査だけの場合には、(糖尿病ではなく)糖尿病型と呼ぶ。糖尿病型を示し、かつ次のいずれかの条件が満たされた場合には、1回だけの検査でも糖尿病と診断できる。①糖尿病の典型的症状(口渇, 多飲, 多尿, 体重減少)の存在, ②HbA1c<sup>※2</sup> $\geq 6.5\%$ , ③確実な糖尿病網膜症の存在, ④過去に高血糖値を示した検査データがある場合は慢性的な高血糖の存在が確実であるので、血糖検査を繰り返さなくても糖尿病と診断できる。一方、空腹時血糖値110 mg/dl未満かつ血糖2時間値が140 mg/dl未満のものを正常型というが、両者の間の正常型にも糖尿病型にも属さないものを境界型(糖尿病予備軍)といい、食事療法等の指導が必要となる<sup>13)</sup>。

※<sup>1</sup>: OGTT (oral glucose tolerance test)・・・75 gのグルコースを内服し、一定時間ごとに血糖値を測定。空腹時血糖値とともに、糖尿病診断のための基本的な検査。

※<sup>2</sup>: HbA1c・・・HbA1cは、赤血球中に含まれるヘモグロビンにグルコースが結合することにより生じる。血糖値と尿糖値に比較して生理的因子による変動がなく、過去1～3ヶ月の平均的血糖値を反映することが知られている。さらに患者の重症度と正の相関があるため、糖尿病の診断マーカーとして重要視されている。

### 1・9 糖尿病急性合併症

急性糖尿病合併症は主に代謝異常に基づく概念であり、糖尿病のいかなる時期にも起こりうる。糖尿病による昏睡には、糖尿病ケトアシドーシスと高血糖性高浸透圧昏睡がある。Ⅰ型糖尿病に多いのが、前者であり、インスリン治療の中断、感染、ストレスなどをきっかけに、糖利用低下、脂質分解亢進に起因し、高血糖と $\beta$ -ヒドロキシ酪酸、アセト酪酸等の著しいケトン体の蓄積が生じる。これを受けて生じる脱水とアシドーシスが本態であり、意識障害（重症では昏睡）をきたす。また、Ⅱ型糖尿病患者のソフトドリンク多飲によって生じる糖尿病ケトosisをソフトドリンクケトosisといい、青年期の高度肥満男性に好発する。病識のない肥満Ⅱ型糖尿病患者がソフトドリンクによるスクロース（ショ糖）の過剰摂取を習慣的に行うことによって、高血糖による糖毒性が生じ、インスリンの分泌と作用がケトosisを生じるまでに低下するという発症メカニズムが考えられている。後者の高血糖性高浸透圧昏睡は、Ⅱ型糖尿病の高齢者に多く、インスリン抵抗性に伴うインスリン作用不足とインスリン拮抗ホルモンの作用亢進によって生じる病態である。著しい高血糖、高浸透圧、脱水を特徴とし、これにより意識障害や痙攣などをきたす。

また、血糖値が生理的な変動範囲を超えて低下することによって、様々な症状を呈した状態を低血糖症という。低血糖症はその原因により、空腹時、反応性、薬剤性の3つに大別される。糖尿病患者においては、経口血糖降下薬やインスリン製剤の不適切な使用、不規則な食事、糖質の摂取不足、アルコールの多量摂取、普段より負荷の大きい運動などが原因になることが多い。高度な低血糖の場合、死に至ることもある。

乳酸アシドーシスは、血液中の乳酸濃度が上昇することにより、血液中のpHが低下して発症するアシドーシスであり、インスリン作用の不足によって誘導されるピルビン酸デヒドロゲナーゼの不活性化が原因の一つとされていて、ピルビン酸の代謝経路が閉鎖されることから、その前段の反応である乳酸からピルビン酸へ代謝されることなく血液中に高濃度に蓄積されることにより誘発されると考えられる。アルコールの大量摂取が原因として多く、死亡率が極めて高い予後不良の合併症である。

## 1・10 糖尿病慢性合併症

糖尿病の慢性合併症として、高血糖の持続による血管性合併症が重要である。分類として、糖尿病に特異的な三大合併症である細小血管症と、糖尿病に特異的ではない大血管症（動脈硬化症）とがある。持続的高血糖による細胞障害のメカニズムはポリオール経路、ヘキシサミン経路の亢進、プロテインキナーゼC活性の亢進、非酵素的糖化反応の亢進、酸化ストレス、血流障害などがあり、①糖が蛋白の遊離アミノ基と化学的に結合する糖化反応により様々な生体内蛋白の機能が障害され、腎糸球体、末梢神経、網膜などにおいて細小血管症が発症する<sup>14)</sup>。また、細胞内代謝経路においては②網膜症やその他合併症とポリオール代謝活性の亢進との関係や<sup>15)</sup>、③Cキナーゼの活性化<sup>16)</sup>などが細小血管症の成因であると提唱されている。④さらに活性酸素による酸化ストレスが糖尿病で亢進していることから<sup>17)</sup>、細小血管症の発症に関与していることが知られている。

高血糖状態が長期にわたると、様々な代謝異常が生じ、これらが複合的に関与して細胞機能障害を引き起こし、糖尿病に特異性の高い細小血管症の発症・進展に関与していると考えられている。最近では、高血圧や高脂血症などの高血糖とは異なるメカニズムが知られている大血管症（動脈硬化）の進展にも、持続的な高血糖や食後高血糖に起因する代謝異常が関係していると考えられている。糖尿病に特異的な三大合併症には以下の3つがある。

### 1・10・1 糖尿病網膜症

細小血管の破綻や血流障害をきたし、これによって網膜の虚血が引き起こされることで、進行すると虚血に陥った神経組織から種々のサイトカインが放出され、新生血管が発生し、硝子体出血や牽引性網膜剥離の原因となる。糖尿病合併症の中でも重要な位置を占めており、糖尿病患者の30～50%に発症し、そのうち10%の人が重症で失明する。年間約3,000人もの高度視力障害者を生み、日本を含め先進諸国で後天失明原因疾患の第一位を占める重大な合併症である。人が得る全情報の85%は視力によると言われており、視力障害は充実した日常生活を過ごす上できわめて重大な障害（QOLの低下）となる。

### 1・10・2 糖尿病腎症

糸球体係蹄の細小血管障害により、糸球体に硬化症病変が生じる。主徴候は蛋白尿であるが、初期に自覚症状はない。しかし、蛋白尿が増え、腎機能が低下してくると、むくみが生じ、血圧が上がる。日本透析医学会統計委員会の集計では、慢性透析療法症例に占める糖尿病性腎症の割合は年々増加しており、特に新規透析導入症例数では、1998年に慢性糸球体腎炎を抜いて第一位となった。患者が人工透析治療を必要とする場合、週に3日ほど通院し数時間かけて体内に溜まっている老廃物や尿の除去を行うため、治療費用に負担がかかるだけでなく治療時間や身体的侵襲などQOLの低下は免れない。

### 1・10・3 糖尿病神経障害

腎症，網膜症に比べ早期から出現し頻度も高い障害であるが，軽視されやすく，発見も遅れることが多い。原因として神経細胞の代謝異常や神経栄養血管の障害などが考えられている。神経障害は足のしびれや痛み，排尿・便通異常等の多彩な症状で患者に苦痛を与える。神経障害が進展すると足先の感覚が鈍くなり，やけどやケガをしても気づかない。これに動脈硬化や様々な程度の末梢血管病変を伴った下肢の感染症が加わると，糖尿病足病変（腫瘍及び壊疽）が起こり，足の切断を余儀なくされる状態まで悪化する。交通事故などの外傷を別にとすると足切断の原因の第一位である。近年，糖尿病の増加・高齢化，合併症の進行，動脈硬化性疾患の併発などを背景に，急速に増加してきており，長期にわたると患者のQOLを著しく低下させ，ときに突然死の原因となる。

### 1・11 糖尿病の治療と予防

糖尿病は完治させることはできないが，個々の病態に応じて食事療法・運動療法・薬物療法を組み合わせながら，生涯を通して治療を持続していくことで，コントロールすることができる疾患であり，日本糖尿病学会では，血糖，体重，血圧，血清脂質の良好なコントロール状態の維持が糖尿病細小血管合併症及び動脈硬化性疾患の発症・進展を阻止をすることから，糖尿病治療の目的を健康な人と変わらない日常生活の質（QOL）の維持，健康な人と変わらない寿命の確保としている。まず，生活習慣を改めるために食事療法と運動療法を行う。食事療法の目的はインスリン分泌異常およびインスリン抵抗性を是正し，できるかぎり正常に近い代謝状態を目指すことである。基本的には，適切なカロリー摂取，糖質・タンパク質・脂質を適切な配分でとること，食事の時間を規則的にすることである。また，運動療法により，インスリン刺激系とは異なる経路でGLUT4の細胞質から細胞膜表面への移動を促進させ，骨格筋の糖取り込みを直接刺激するとともに，インスリン感受性を増強させ，血糖値を下げることができ，運動療法の持続により肥満が解消されれば，さらにインスリン抵抗性が改善し，血糖値を正常化するためのインスリン必要量が減少することも提唱されている。

生活習慣の改善だけで血糖のコントロールが不可能な患者の糖尿病の治療法は，インスリンの補充を目的としたインスリン製剤とインスリン分泌促進薬，インスリンの反応性の復元を意図したインスリン抵抗性改善薬，糖質のグルコースへの分解あるいは消化・吸収速度の緩和を行う食後高血糖抑制薬に分類される。原則として食事・運動療法が適切に行われているにも関わらず十分な血糖コントロールが得られないⅡ型糖尿病患者に対し使用されている経口血糖降下薬は，その作用機序により，インスリン分泌促進薬，インスリン抵抗性改善薬， $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害

薬に分類され、インスリン分泌促進薬にはスルホニル尿素薬とフェニルアラニン誘導体薬が、インスリン抵抗性改善薬にはピクアナイト薬とチアゾリジン誘導体薬がある (Fig.8)。

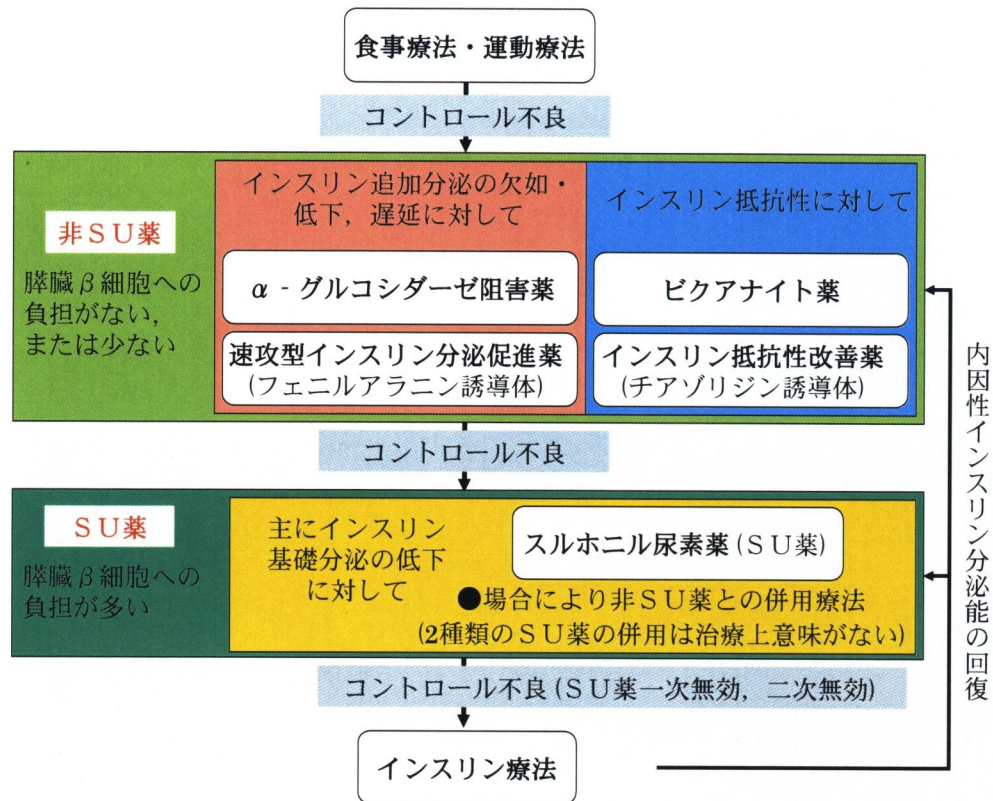


Fig. 8 経口血糖降下薬の選択



### 1・11・1 インスリン療法

外部からインスリンを投与することにより、できる限り正常に近いインスリン分泌動態を得ることを目的とする治療法である。健常人のインスリン分泌形態は、一日中少量のインスリンが分泌される基礎分泌と食事後に分泌される追加分泌から構成されており、Ⅰ型糖尿病では双方が欠落しており、Ⅱ型糖尿病では、とりわけ追加分泌に減衰が見られる。インスリン療法は、患者のインスリン分泌能の態様に合わせて、その不足分の補充に用いられる。インスリン療法の副作用としては低血糖があげられる。ヒトインスリンに加え、最近では作用特性を分子レベルで改変したインスリンアナログが使用されるようになっている<sup>18)</sup>。

### 1・11・2 インスリン分泌促進薬

#### 1・11・2・1 スルホニル尿素薬（SU薬）

作用機序は、膵臓β細胞のスルホニル尿素受容体に直接結合し、ATP依存性K<sup>+</sup>チャンネルを閉鎖することによってインスリン分泌を刺激する<sup>19)</sup>。SU薬はインスリン分泌量を増加させるが、食後の血糖値上昇に応じて瞬時に起こるインスリンの欠如や低下を改善することはできず、また、極度に内因性のインスリン分泌能が低下している場合も効果は得られない。このため、膵臓β細胞の機能がある程度保たれていて、空腹時血糖値が上昇しているⅡ型糖尿病患者に適応される。血糖値降下作用は強力であるが、主な副作用として低血糖、肝障害、腎障害、白血球減少、貧血などがある。また、インスリン分泌量を増加させるため、肥満を助長しやすい。また、肥満の進行がインスリン抵抗性の増大を招き、病態を悪化させることもある。長期間の使用によって、膵臓β細胞が疲弊し、二次的に効果が低下することもある。

#### 1・11・2・2 フェニルアラニン誘導体（速効型インスリン分泌促進薬）

作用機序は、膵臓β細胞のスルホニル尿素受容体に直接結合し、ATP依存性K<sup>+</sup>チャンネルを閉鎖することによってインスリン分泌を刺激する<sup>20)</sup>。SU薬に比べインスリン分泌刺激の効力は弱いですが、短時間で作用するため、インスリン分泌のピークを早期の段階にシフトさせることができる。このため、インスリンの追加分泌が欠如した症例の食後の血糖値を是正することができるが、基礎分泌の低下がある症例には効かない。主な副作用として低血糖、肝障害、腎障害、白血球減少、貧血などがある。速やかに血中から消失するため、スルホニル尿素薬（SU薬）に比べて低血糖をきたしにくい。

### 1・11・3 インスリン抵抗性改善薬

#### 1・11・3・1 チアゾリジン誘導体

作用機序は、チアゾリジン誘導体（TZD）が核内受容体であるPPAR $\gamma$ の強力なアゴニストであることから、主にPPAR $\gamma$ に作用することでインスリン抵抗性を改善すると考えられる<sup>21)</sup>。PPAR $\gamma$ は特に脂肪細胞に多く発現し、その分化誘導に関与していることから、脂肪細胞がTZDの標的細胞であるとする考えが一般的であるが、直接骨格筋や肝臓に作用してインスリン抵抗性を改善させるという報告もある。主な副作用として肝機能障害、浮腫、心不全、貧血などがある。

#### 1・11・3・2 ビクアナイト薬

作用機序は、AMPキナーゼの活性化によるGLUT4の細胞膜表面へのトランスロケーションの促進であり、これによって標的細胞内にグルコースを取り込むことにより血糖値が下がる<sup>22)</sup>。古くから使用されてきた糖尿病治療薬である。インスリン分泌を誘導しないことから、低血糖や肥満の増悪を誘発しにくい。一方、単独では効果が弱いことから、SU薬と併用して用いられることが多い。フェンホルミンによる副作用、乳酸アシドーシスが問題となり使用は一時激減していたが、最近では有用性が見直されている。これは大規模臨床試験によって肥満糖尿病患者における血糖低下作用や他薬併用療法の有用性が再確認されたことに加え、UKPDS（UK Prospective Diabetes Study）においてビクアナイト薬治療群は糖尿病関連の合併症（心筋梗塞、虚血性心疾患、脳血管障害など）の発症率及び死亡率が他の治療法（SU薬やインスリン療法）群より有意に低率であることが示されたためである<sup>23)</sup>。主な副作用として嫌気性解糖の亢進による乳酸ケトアシドーシスなどがある。

#### 1・11・4 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬

作用機序は、十二指腸および小腸粘膜の刷子縁に局在するマルターゼ、スクラーゼなどの二糖類加水分解酵素の競合的かつ拮抗的な阻害である<sup>24)</sup>。一般的な日本人が食事として摂取する糖質の構成は、約55%がデンプン、約35%がスクロース、約5%がラクトース、約3%がフルクトースである。摂取した炭水化物からグルコースやフルクトースへの分解が徐々に起こり、十二指腸・空腸上部から消化吸収するようになるため、十二指腸・空腸上部での吸収は少なくなり、小腸中部・下部で吸収するようになる。したがって、小腸全体で単糖の吸収が行われるため急峻な血糖上昇が穏やかになり、食後の高血糖の抑制、インスリン分泌の抑制、過激なインスリン反応の改善により、血糖状態が良好になる。主な副作用として消化器症状（腹部膨満、放屁、下痢など）、低血糖、肝機能障害などがある。

## 1・12 食品機能による糖尿病予防

糖尿病有病者は2010年には1,080万人に達すると推定されている。健康日本21では、発症前の段階で生活習慣の中の危険因子を取り除き、糖尿病を予防すること（一次予防）が重要であると提唱している。糖尿病患者の経口血糖降下薬にアガルボース（商品名：グルコバイ、バイエル社）やボグリボース（商品名：ベイズン、武田薬品工業）やミグリトール（商品名：セイブル、三和化学）等の $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬がある<sup>25, 26, 27)</sup>。糖尿病予備軍域患者1,429名を用いたSTOP-NIDDM試験によって、アカルボースの摂取（194 mg/day）が糖尿病発症（悪化）リスクを25%低減させるのに極めて有効であることが判明した<sup>28, 29)</sup>。この知見は、食後の血糖値上昇コントロールが糖尿病予防対策として有効なことを示しており、食品機能による医療代替性を示唆するものであった。このように、糖質の分解酵素の活性を阻害することは糖尿病の予防と治療で重要な役割を果たす。しかしながら、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬等の経口血糖降下薬は糖尿病と診断された糖尿病患者しか使用することのできない医薬品である。また、近年、Ⅱ型糖尿病の増加に伴う、生活習慣病の治療費は急速に増大し、社会経済的圧迫となってきた。そのため、食品が本来持っている生活習慣病を予防する効果を科学的実証する研究開発の展開を促す状況を踏まえ、食品成分の吸収・代謝・生理機能の研究が進み、食品成分の健康保持、疾病の改善・予防の効果が多く研究されている。糖尿病悪化・発症の予防に関する研究において注目されているのは、普段の生活で血糖値上昇を抑えるために食事からの糖質や脂質の吸収抑制作用をもつヘルスフードである。すでに特定保健用食品として市場に出回っている「血糖値が気になり始めた方の食品」の素材で糖の吸収を穏やかにする成分として、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害作用を有する小麦アルブミン<sup>30)</sup>、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を有するグアバ葉ポリフェノール<sup>31)</sup>や豆鼓エキス<sup>32)</sup>、糖の消化・吸収阻害作用を有する難消化性デキストリン<sup>33)</sup>、また砂糖の代替品としてのL-アラビノース<sup>34)</sup>などが挙げられる。ここで挙げた成分のほとんどが糖の吸収を穏やかにして血糖値の上昇を抑制するもので糖尿病の予防という意味で非常に重要である(Fig.9)。

小麦アルブミンは小麦由来の可溶性タンパクであり、等電点は7.3、電気泳動の移動度から0.19小麦アルブミンと呼ばれる。熱変性点は93℃と高く、安定なタンパクであることが報告されている。ヒト唾液および膵液アミラーゼの阻害活性を示し、消化管内のアミラーゼ活性を一時的に低下させることによって、糖質の消化吸收を遅延させることにより血糖値の急激な上昇を抑制する。0.19-小麦アルブミン1分子（ホモダイマー）が、アミラーゼ1分子と結合し、阻害活性を示すことが明らかとなっている。グアバ葉ポリフェノールは緑茶や烏龍茶には含まれないグアバ茶特有のものであり、活性成分は分子量5,000～30,000の分布をもつ複合タンニン様物質であり、糖質分解酵素である $\alpha$ -アミラーゼや $\alpha$ -グルコシダーゼを阻害することによって、糖質の消化

吸収を遅延させることにより血糖値の急激な上昇を抑制する。豆鼓エキスは、大豆を麴により発酵させた中国伝統食品の「豆鼓（トウチ）」を水抽出して得られるエキスであり、 $\alpha$ -グルコシダーゼを阻害して、糖質の消化吸收を遅延させることにより血糖値の急激な上昇を抑制する。難消化性デキストリンは、デンプン由来の水溶性食物繊維であり、淡黄色で分子量は約 1,000 である。低粘性・低甘味で水溶液はほぼ透明であり、耐熱性・耐酸性に優れている。ミネラルの吸収阻害はなく、FDA（米国食品医薬品局）の GRAS（Generally Recognized As Safe の略称、米国における食品安全性に関する審査制度）にリストされた安全性の高い素材である。二糖類以上の糖質の吸収を緩やかにすることにより、食後血糖値の上昇を抑制する。

また、天然物から単離された血糖値上昇抑制作用を有する化合物として、桑の葉に含まれる成分である 1-デオキシノジリマイシンはグルコースと類似した化学構造をしていることから、二糖を単糖に分解する  $\alpha$ -グルコシダーゼを阻害することにより、糖質の消化吸收を遅延させることにより血糖値の急激な上昇を抑制する<sup>35)</sup>。ギムネマシルベスタの活性成分であるギムネマ酸という甘味抑制物質が小腸におけるグルコースの吸収阻害作用を示すこと<sup>36)</sup>、またサラシアの活性成分であるサラシノールとコタラノールが  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害作用を示すことが報告されている<sup>37)</sup>。

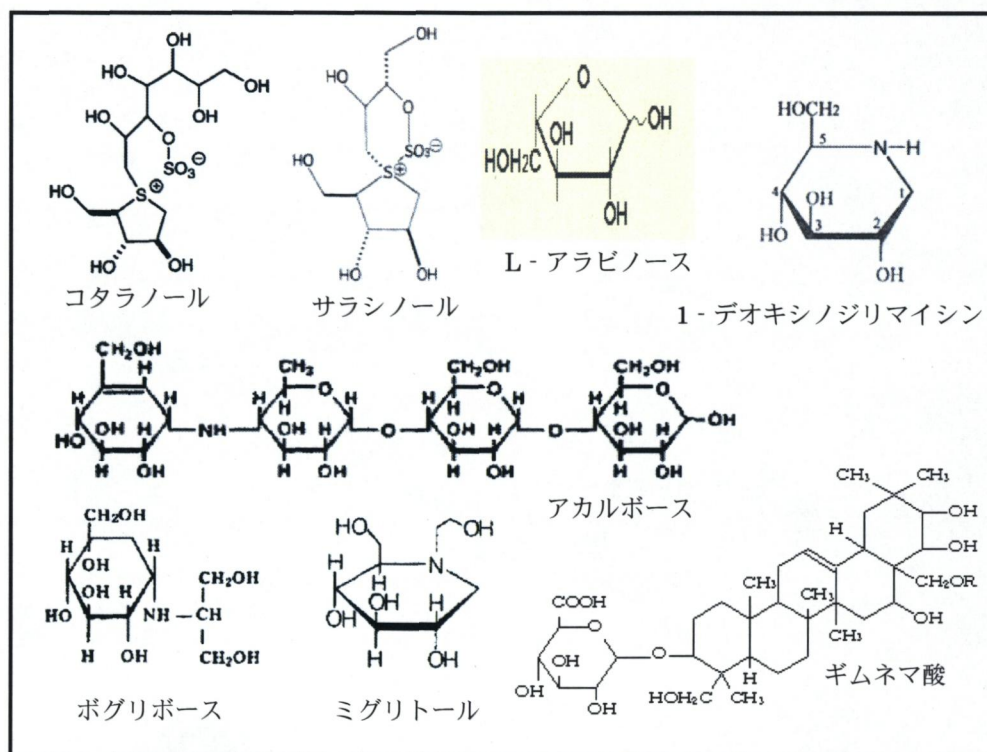


Fig. 9  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬と「血糖値が気になり始めた方の食品」に含まれる関与成分

## 1・13 本研究の目的

「糖尿病の予防」は、糖尿病予備軍と呼ばれる半病人状態の特殊な人々だけに関係していると思われがちだが、健康な人々にも重大な問題である。本研究ではマウスを用いて食後の血糖値上昇を抑制する食品成分をスクリーニングすることによって、血糖値上昇抑制作用を有する新規食品素材を探索することを目的として研究を行った。日本人が一般的に摂取する糖質の構成は、約55%がデンプンであるため、スクリーニングでは、基質にデンプンを用いた*in vitro*試験の $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験と*in vivo*試験のデンプン負荷試験を行った。サンプルの抽出溶媒は一般的に用いられ、アルコールとして安価なメタノールを用いた。本論文では、スクリーニングにより活性を見出したサンプルうち、糖尿病予防に有用で、サンプルの供給源が安定し、消費者が親しみやすいサンプルの血糖値上昇抑制作用について検討した。また、植物の部位としては葉を中心にスクリーニングを行った。植物の樹皮、根、種、花等は漢方の原料として使用されていることが多く、その場合、食品としては使用しにくい。それと比較して、植物の葉は漢方の原料になっていないことが多く、また植物体の成分が一様に含まれている可能性が高いと推測した。さらに、生育分布の多い植物であればあるほど、葉の調達が容易である。果樹の場合、果実については市場性があるが、その葉については食品として未利用である場合があり、果実収穫後とくに利用されていなかった未利用資源である。果樹の葉を使用することによって、果実と同様に市場性を持たせることができ、未利用資源の有効利用にも貢献できると考えた。

機能性食品の生理活性を研究する際、食品は消化管での消化・吸収過程を経て体内に移行し有効性を発揮するため、実験動物に経口摂取した場合の有効性を確認する必要があると考える。必要最低限の動物実験以外にも酵素実験などの代替実験を用いて、発見した新規食品物質の作用メカニズムやヘルスフードとしての有用性も併せ検討を行った。

## 第2章 実験方法

### 2・1 試薬

溶性デンプン、スクロース、マルトース、グルコース、コレステロール、コール酸ナトリウム、ストレプトゾトシン、グルコース CII テストワコーキット、コレステロール E - テストワコーキット、トリグリセライド E - テストワコーキットは和光純薬（大阪）から購入した。豚膵臓由来  $\alpha$  - アミラーゼ（EC 3.2.1.1）は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。ボグリボースは武田薬品工業株式会社（大阪）から購入したベイズン錠 0.3 を用いた（本薬剤は 1 錠中 0.3 mg のボグリボースを含有する）。この論文中にある他の試薬は和光純薬から購入した。

### 2・2 実験動物

雄性の Std : ddY マウスは日本 SLC（浜松）から購入した。飼育環境は温度（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）、湿度（ $50 \pm 10\%$ ）、および照明 8:00～20:00（12 時間サイクル）で制御した。水と固形飼料は自由摂取で、固形飼料には MR ストック（日本 SLC）を用いた。一週間予備飼育を行い、実験には 6～8 週齢のマウスを用いた。

### 2・3 サンプルの調製

スクリーニング源として、研究室に保管されていたサンプルとサンプリングで採集したサンプルと岡山県で採集したサンプルを用いた。本論文では、スクリーニングにはサンプルのメタノール抽出物を用い、さらに抽出条件の検討においてエタノール抽出と熱水抽出を行った。アルコール抽出については、サンプルを洗浄し、水気を取った後細かく切断し、10 倍量の原液アルコール（メタノールまたはエタノール）に室温で数日から一ヶ月間浸漬した後、ろ過し、エバポレーターで減圧濃縮し、凍結乾燥機で粉状にしたものをメタノール（エタノール）エキスとした。収率はエキス粉末重量／サンプル乾燥後重量（w/w）で表した。熱水抽出については、サンプルを洗浄し、水気を取った後細かく切断し、乾燥機で一晩、設定温度で乾燥させ、5～100 倍量の水を加え、一時間煮出した後、ろ過し、エバポレーターで減圧濃縮し、凍結乾燥機で粉状にしたものを熱水エキスとした。収率はエキス粉末重量／サンプル乾燥後重量（w/w）で表した。両抽出エキスは実験に使用するまで  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。また、ポジティブコントロールとして市販の蕃爽麗茶（株式会社ヤクルト本社）をエバポレーターで減圧濃縮し、凍結乾燥機で粉状にしたもの（以下、蕃爽麗茶エキス）と市販の黒烏龍茶（サントリー株式会社）をエバポレーターで減圧濃縮し、凍結乾燥機で粉状にしたもの（以下、黒烏龍茶エキス）を用いた。

## 2・4 マウスを用いた糖負荷試験

マウスを 24 時間絶食後、実験前に各群の平均体重が均等になるように群分けをした。糖負荷試験に用いるための溶性デンプン、マルトース、グルコースは 1,000 mg/kg を、スクロースは 2,000 mg/kg（グルコースのみ測定できるキットを用いるため 2 倍）を 1 ml の蒸留水に溶解させた。溶性デンプン溶液は糖負荷試験直前に、恒温槽で 100℃ で 10 分間加熱し、 $\alpha$  化した。サンプル投与群では、各々の糖とサンプルを混合して 1 ml の蒸留水に溶解させ、ゾンデを用いてマウスの胃内へ直接経口投与した。採血は経口投与後、0（経口投与前）、30、60、90、120、240 分時にマウスの尾部より行い、抗凝固剤を添加したマイクロチューブに血液を採血し、採血した血液サンプルは直ぐに 10,000 rpm で約 2 分間遠心分離し、血漿を 2  $\mu$ l とり、96 ウェルプレートに分注し、これを測定試料とした。血漿中のグルコース濃度測定にはグルコース CII テストワコー（ムタローゼ・GOD 法）を使用し、492 nm で吸光度を測定し、検量線から血糖値を求めた。

## 2・5 糖質分解酵素阻害活性試験

### 2・5・1 $\alpha$ - アミラーゼ阻害活性試験

$\alpha$  - アミラーゼ阻害活性試験は Xiao らの方法を改良して行った<sup>38)</sup>。2 mM  $\text{CaCl}_2$  と 0.2% ウシ血清アルブミン含有 0.1 M リン酸 Buffer (pH 6.9)、基質として 2.5 mg/ml の溶性デンプン溶液（和光純薬）、酵素として 0.2 units の豚膵臓由来  $\alpha$  - アミラーゼ (EC 3.2.1.1)、呈色液にヨウ素溶液を用い、一定時間の反応ののち分解されずに残存したデンプンをヨウ素デンプン反応で評価した。96 ウェルプレートに Buffer とサンプルの希釈段階を作製し、総量 50  $\mu$ l とした。ここに  $\alpha$  化させた基質を 50  $\mu$ l 加えて、37℃ で 5 分間プレインキュベーションした。反応は酵素を 100  $\mu$ l 加えることによって開始し、37℃ で 10 分間インキュベーションした。インキュベーション後、反応停止液と呈色液の混合液 100  $\mu$ l を反応液に加え、反応停止直後に 600 nm で吸光度を測定した。 $\alpha$  - アミラーゼ阻害活性はサンプルを含有していないコントロールと比較して阻害率 (%) で表し、 $\alpha$  - アミラーゼ活性を 50% 阻害する値を  $\text{IC}_{50}$  値として表した。

#### 2・5・2 $\alpha$ - グルコシダーゼ阻害活性試験

$\alpha$  - グルコシダーゼ（マルターゼ，スクラーゼ）はマウスの小腸上皮から回収した。6～8 週齢の雄性の Std : ddY マウス（日本 SLC）を使用し，24 時間絶食後，頸椎脱臼で屠殺し十二指腸，空腸，回腸を含む小腸を摘出した。氷冷した生理食塩水で軽くすすぎ，摘出の際付着した血液を洗淨してから，氷冷した 0.2%ウシ血清アルブミン含有 0.01 M リン酸 Buffer 4 ml を用いてマウス 1 匹分の腸の内壁物を回収した。数匹分のマウス腸内容物を合わせて 1,500 rpm で約 5 分間遠心分離し，不溶物を除いた上清を  $\alpha$  - グルコシダーゼ粗酵素液とした。 $\alpha$  - グルコシダーゼ阻害活性はスクロースとマルトースを基質として Dahlqvist らの方法を修正して行った<sup>39)</sup>。96 ウェルプレートに 0.1 M リン酸 Buffer (pH 6.9) とサンプルの希釈段階を作製し，総量 50  $\mu$ l とした。ここに基質である 166 mM スクロースを 50  $\mu$ l 加えて，37℃で 5 分間プレインキュベーションした。反応は上記方法で調製した  $\alpha$  - グルコシダーゼ粗酵素液を 100  $\mu$ l 加えることによって開始し，37℃で 30 分間インキュベーションした。インキュベーション後，60  $\mu$ l を新しい 96 ウェルプレートに移し，グルコース CII テストワコーキットを用いて，吸光度 492 nm で測定した。 $\alpha$  - グルコシダーゼ阻害活性はサンプルを含有していないコントロールと比較して阻害率 (%) で表し， $\alpha$  - グルコシダーゼ活性を 50% 阻害する値を IC<sub>50</sub> 値で表した。



## 2・6 マウス腸管におけるグルコースの吸収阻害試験

6～8 週齢の雄性 ddY マウスを 24 時間絶食後、実験前に各群の平均体重が均等になるように群分けをした。ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液，大日本住友製薬株式会社）を 50 mg/kg 腹腔内投与し麻酔した。腹部を切開し，胃の胃底部から経口投与用ゾンデを挿入できるように胃壁を小切開し，十二指腸に直接 1 ml のグルコース溶液もしくは 1 ml のグルコースとサンプルの混合溶液を注入し，胃の幽門部と幽門部から約 15 cm の腸管部分を絹糸で結紮した。その 30 分後に結紮した腸管部分を摘出し，腸管の内容物を 5 ml の生理食塩水で洗い出し回収した。洗い出した腸管内容物のグルコース濃度と液量を測定し，腸管内のグルコース残量を算出した。また，糖注入前と糖注入後 30 分時の血糖値測定を行なった。グルコース濃度と血糖値の定量にはグルコース CII テストワコーキットを用いた。腸管内に残存したグルコース残量は注入前のそれぞれの溶液と比較してグルコース残存率（％）で表した(Fig.10)。

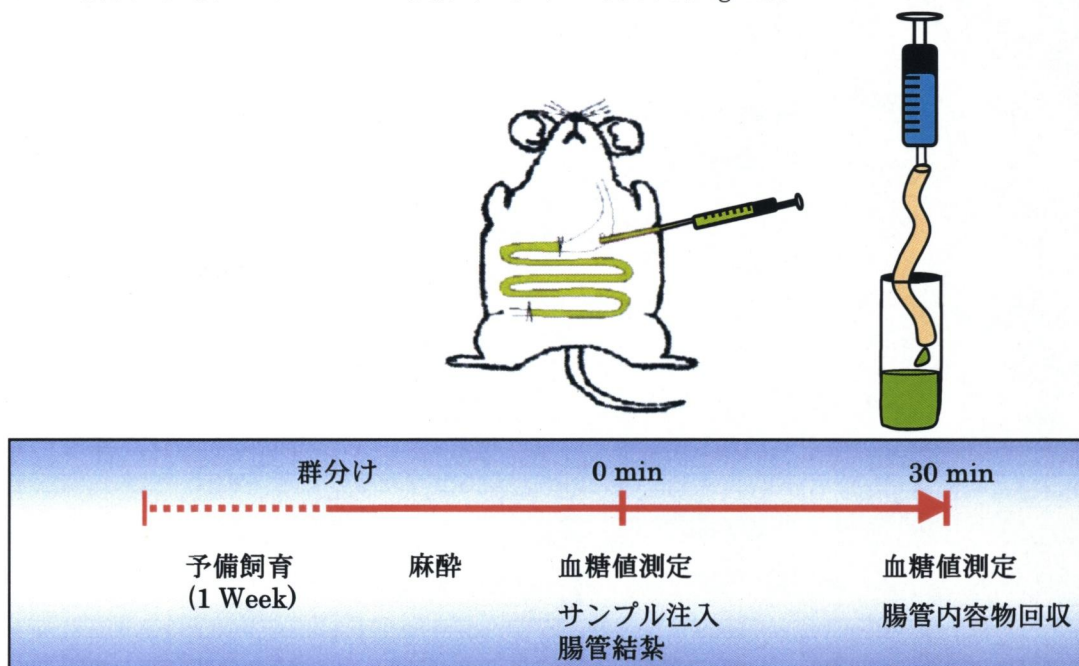


Fig.10 腸管におけるグルコース吸収阻害活性試験

## 2・7 糖尿病モデルマウスを用いた長期試験

### 2・7・1 飼料組成

Table 1 飼料組成

AIN-93M (維持用)	コントロール食 (%)	サンプル食 (%)
カゼイン	14.0	14.0
L-シスチン	0.18	0.18
コーンスターチ	46.5692	36.5692
サンプルエキス	0.0	10.0
$\alpha$ 化コーンスターチ	15.5	15.5
スクロース	10.0	10.0
大豆油	4.0	4.0
セルロースパウダー	5.0	5.0
AIN-93M ミネラル混合	3.5	3.5
AIN-93M ビタミン混合	1.0	1.0
重酒石酸コリン	0.25	0.25
第三ブチルヒドロキノン	0.0008	0.0008
合計	100	100

Table 1 に飼料組

成を示した。コントロール食のコーンスターチにあたる部分を、サンプル食ではモモ葉エキスに置き換えて調製した。カゼイン→コーンスターチ→ $\alpha$ 化コーンスターチ→スクロース→セルロースパウダー→AIN - 93M ミネラル混合→AIN - 93M ビタミン混合→L - シスチン→重酒石酸コリン→第三ブチルヒドロキノンの順番で混合し、大豆油を混合後、サンプルエキスを全体によく馴染むように混合し、最後に蒸留水を加えて全体を練り上げ、円柱型に成形し、飼料が完全に乾燥するまで 70℃で一晩乾燥させた (Fig.11)。各飼料原料はオリエンタル酵母から購入した。飼料調製用に使用したモモ葉エキスは熱水抽出により得られたモモ葉 Water エキス (収率 30%) と、熱水抽出後のモモの葉を再びメタノール抽出したモモ葉 MeOH エキス (収率 3.3%) を用いた。

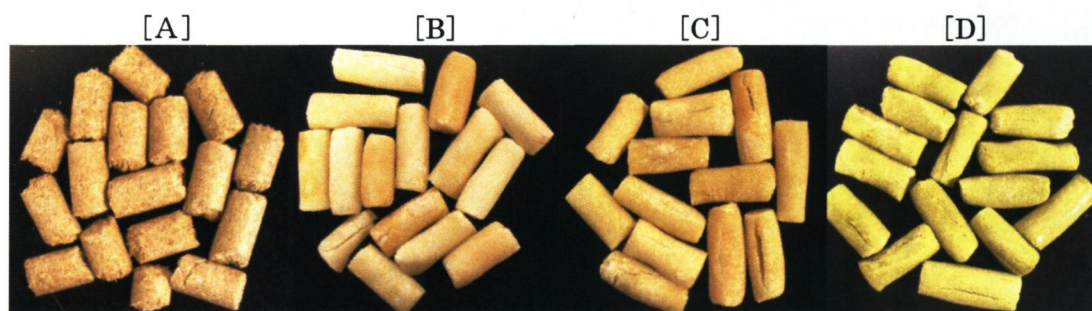


Fig.11 MR ストックと調製した飼料

A : MR ストック B : コントロール食 C : モモ葉 Water エキス食 D : モモ葉 MeOH エキス

## 2・7・2 ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病モデルマウスを用いた糖尿病発病予防試験

雄性のddYマウスは3週齢で購入し、体重が均一になるように群分けをした(正常マウスn=10, 糖尿病モデルマウス n=20)。サンプル食を用いて一週間の予備飼育した後、糖尿病を誘発するため予備飼育後 STZ 群には STZ 200 mg/kg を生理食塩水に溶解し腹腔内注射(0.1ml/kg)した。コントロール群には生理食塩水のみを腹腔内注射(0.1ml/kg)した。サンプルは 20 日間実験終了まで与えた。飼料の投与期間中は、血糖値測定と体重測定を午前中に行い、飼料の摂餌量を測定した。また、最終日に解剖を行い、臓器重量を測定した(Fig.12)。

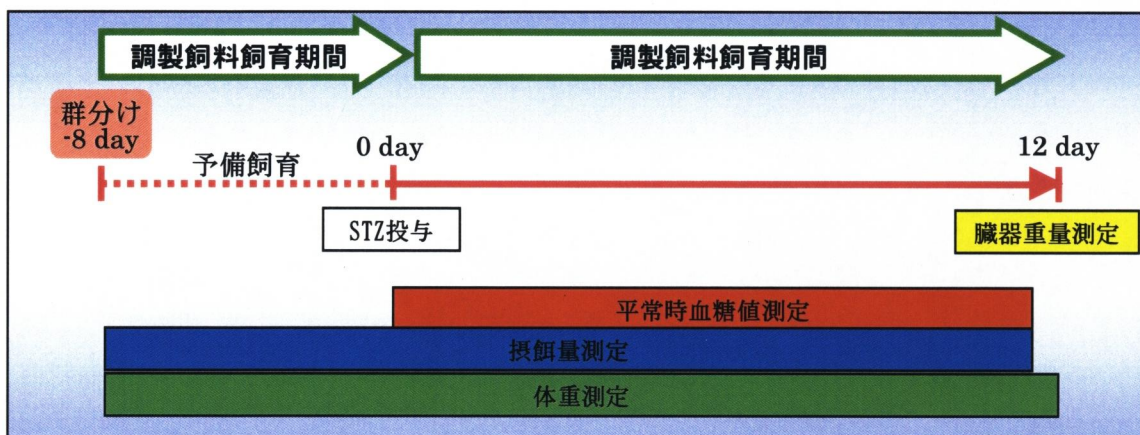


Fig.12 ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病モデルマウスを用いた糖尿病発病予防試験



### 2・7・3 ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病モデルマウスにおける糖尿病改善試験

雄性の ddY マウスは 3 週齢で購入し、固形飼料 (MR ストック, 日本 SLC) を用いて一週間の予備飼育した。STZ 誘発糖尿病モデルマウスを作成するために、予備飼育後 STZ 群には STZ 200 mg/kg を生理食塩水に溶解し腹腔内注射(0.1ml/kg)した。コントロール群には生理食塩水のみを腹腔内注射(0.1ml/kg)した。2 日後、平常時血糖値が 300 mg/dl 以上のものを糖尿病モデルマウスとし、平常時血糖値が均一になるように群分けした (正常マウス n=10, 糖尿病モデルマウス n=20)。コントロール群, STZ 群には調製した飼料のコントロール食, サンプル食をそれぞれ STZ 投与日から 10 日間実験終了まで与えた。飼料の投与期間中は血糖値測定と体重測定を午前中に行い、飼料の摂餌量を測定した。また、最終日に解剖を行い、臓器重量を測定した(Fig.13)。

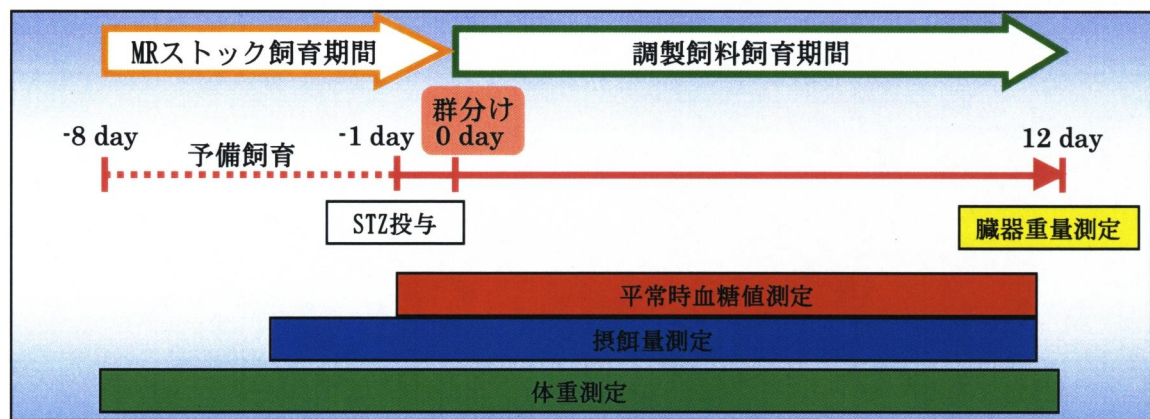


Fig.13 ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病モデルマウスにおける糖尿病改善試験

#### 2・8 マウスを用いた脂質負荷試験

マウスを 24 時間絶食後、実験前に各群の平均体重が均等になるように群分けをした。脂質負荷試験に用いるためのコレステロール 146 mg/kg, コール酸ナトリウム 36 mg/kg はオリーブオイルに加え、超音波処理し、均一な懸濁液を調製した。コントロール群ではオリーブオイル懸濁液 (18 ml/kg) と蒸留水 (18 ml/kg) を、サンプル投与群では、オリーブオイル懸濁液 (18 ml/kg) と蒸留水 (18 ml/kg) に溶解させたサンプルを、ゾンデを用いてマウスの胃内へ直接経口投与した。採血は経口投与後、0 (経口投与前), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 時間後にマウスの尾部より行い、抗凝固剤を添加したマイクロチューブに血液を採血し、採血した血液サンプルは直ぐに 5,000 rpm で約 2 分間遠心分離し、血漿を 2  $\mu$ l とり、96 ウェルプレートに分注し、これを測定試料とした。血漿中の総コレステロール濃度測定にはコレステロール E $\square$ テストワコーキット (コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法) を使用し、492 nm で吸光度を測定し、検量線から血漿総コレステロール値を求めた。

また、血漿中のトリグリセライド濃度測定も上記と同様の方法で行い、血漿中のトリグリセライド濃度測定にはトリグリセライド E $\square$ テストワコーキット (GPO・DAOS 法) を使用し、600 nm で吸光度を測定し、検量線から血漿トリグリセライド濃度を求めた。

#### 2・9 統計処理

結果の値は平均  $\pm$  標準誤差で表した。各群間の有意差は Student's *t*-test によって評価し、 $p < 0.05$  を統計的に有意であるとした。

## 2・10 分離・精製の操作

### 2・10・1 分離精製の基本操作

溶媒の濃縮は、ダイアフラム真空ポンプの減圧下（30～50 mmHg）、ロータリーエバポレーターを用い、水浴温度 20～30℃で行った。水の濃縮は凍結乾燥によって行った。

溶媒類は市販の特級および HPLC 用を用いた。

### 2・10・2 クロマトグラフィー

#### (a) カラムクロマトグラフィー

ODS シリカゲルはナカライテスク（株）製の ODS シリカゲル Cosmosil 75C18 - OPN を用いた。使用した充填剤の重さ、展開溶媒は以下の様式で記載した。

[充填剤（充填剤の重さ）、展開溶媒]

#### (b) 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

目的とする成分の分析および分取には、日本分光（製）の送液ポンプ PU - 2089i plus 型装置および紫外分光光度計 UV - 2070i plus 型装置を用いた。カラムは野村化学（株）製 Develosil ODS HG - 5 を用いた。使用したカラム、展開溶媒、流速、検出法は以下の様式で記載した。

[カラム（内径（mm）×長さ（mm））、展開溶媒、流速、検出法]

#### (c) 分析用薄層クロマトグラフィー（TLC）

E. Merck 社製 TLC プレート、シリカゲル 60 F<sub>254</sub> (Art. 1.05715), ODS RP - 18WF<sub>254S</sub> (Art. 1.13124) を用いた。化合物の検出は、UV (254 nm) の照射と、*p* - アニスアルデヒドの含水エタノール溶液 (95% エタノール 500 ml, *p* - アニスアルデヒド 13.7 ml, 濃硫酸 18.4 ml, 酢酸 5.6 ml より調製) に浸し、ホットプレート上で加熱発色させることにより行った。

#### (d) 分取用薄層クロマトグラフィー（PLC）

E. Merck 社製 PLC プレート、シリカゲル 60 F<sub>254</sub> (Art. 1.13895) を用いた。化合物の検出は、UV (254 nm) の照射と、*p* - アニスアルデヒドの含水エタノール溶液 (95% エタノール 500 ml, *p* - アニスアルデヒド 13.7 ml, 濃硫酸 18.4 ml, 酢酸 5.6 ml より調製) に浸し、ホットプレート上で加熱発色させることにより行った。

## 2・11 機器分析

### 2・11・1 $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H}$ NMR)

ブルカー（株）製 AV400M 型装置（400 MHz）を用いて測定し、以下の様式で記載した。

$^1\text{H}$  NMR（測定周波数，測定溶媒）， $\delta$  化学シフト値（多重度，スピン結合定数，水素数）

化学シフト値は測定溶媒の残留プロトンのシグナルを内部標準[ $\text{CD}_2\text{HOD}$  (3.30 ppm)] として，ppm で記載した。多重度は s（単一線），d（二重線），t（三重線） q（四重線），m（多重線あるいは複雑に重なったシグナル）と略記した。スピン結合定数  $J$  は Hz で記載した。

### 2・11・2 $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル ( $^{13}\text{C}$ NMR)

ブルカー（株）製 AV400M 型装置（100 MHz）を用いて測定し、以下の様式で記載した。

$^{13}\text{C}$  NMR（測定周波数，測定溶媒）， $\delta$  化学シフト値（多重度）

化学シフト値は測定溶媒のシグナルを内部標準[ $^{13}\text{CD}_3\text{OD}$  (49.5 ppm)] として，ppm で記載した。多重度は HMQC スペクトルより推定し，s（四級炭素），d（メチン炭素），t（メチレン炭素），q（メチル炭素）と略記した。

### 2・11・3 二次元核磁気共鳴スペクトル

ブルカー（株）製 AV400M 型装置（400 MHz）を用いて、以下の条件で測定した。

- (1) COSY：データポイント数 (512 × 128)
- (2) HMQC：データポイント数 (512 × 128)， $\Delta t = 1/2 J = 180 \text{ ms}$  [ $^1J_{\text{CH}} = 145 \text{ Hz}$ ]
- (3) HMBC：データポイント数 (512 × 128)， $\Delta m = 1/2 J = 83 \text{ ms}$  [ $^{2,3}J_{\text{CH}} = 6 \text{ Hz}$ ]
- (4) NOESY：データポイント数 (512 × 128)
- (5) DEPT：データポイント数 (512 × 128)

### 2・11・4 高分解能質量分析

PE - Biosystem（株）製 QSTAR 型装置を用いて測定した。イオン化法としては，エレクトロスプレーイオン化法（ESI）を適用し，以下の様式で記載した。測定値は「測定値」，分子式からの計算値を「計算値」として記載した。

高分解能質量分析（イオン化法）

### 2・11・5 紫外可視吸収スペクトル

日本分光（株）製 V - 550 型紫外可視分光光度計を用いて測定し，以下の様式で記載した。

UV（溶媒）： $\lambda_{\text{max}}$  吸収波長（nm）

### 第3章 血糖値上昇抑制作用を有する新規食品素材の探索

#### 3・1 一次スクリーニング

血糖値上昇抑制作用を有する新規食品素材のスクリーニングには、一次スクリーニングに *in vitro*試験の  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験または *in vivo*試験のマウスを用いたデンプン負荷試験を平行して行った。一次スクリーニングで  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性が確認されたサンプルについて二次スクリーニングとして *in vivo*試験のマウスを用いたデンプン負荷試験を行うことにより *in vivo*試験での作用を確認した。 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験には、481種類のサンプルを供し、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験により、デンプン残存率が高いサンプルから順に二次スクリーニングを行った。また一次スクリーニングとして実施したマウスを用いたデンプン負荷試験には、139種類のサンプルを供した。デンプン負荷試験では、糖負荷後30分時の血糖値をコントロールと比較して血糖値上昇抑制作用の有無を判断した。

スクリーニングの結果をTable 2に示した。 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験では、481サンプル中の30サンプルに  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性が見られ、その後、9サンプルについてデンプン負荷試験を行ったところ、6サンプルで有意な血糖値上昇抑制作用が見られた。また、一次スクリーニングとしてデンプン負荷試験を行った場合では139サンプル中の15サンプルに血糖値上昇抑制作用が見られた。本研究で一次スクリーニングに  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験を用いた場合、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を有すサンプルの割合は6.2%であった。また、一次スクリーニングにデンプン負荷試験を用いた場合、血糖値上昇抑制作用を有するサンプルの割合は10.8%であった。

Table 2 血糖値上昇抑制作用を有する新規食品素材の一次スクリーニング

	総サンプル数	血糖値上昇抑制作用を有したサンプル数	活性含有率(%)
$\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験	481	30	6.2
デンプン負荷試験のみ	139	15	10.8

#### 3・2 血糖値上昇抑制作用を有する果樹の葉のスクリーニング

上記スクリーニングの結果、植物の中でも果樹の葉に  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性が高いサンプルが多かったので、これらサンプルのマウスにおける血糖値上昇抑制作用をTable 3に示した。



Table 3 果樹の葉の血糖値上昇抑制作用

科	属		コントロール群		サンプル投与群		有意差検定
			0 分時	30 分時	0 分時	30 分時	
バラ科	サクラ属	モモ	118.0±6.9	228.9±9.0	125.1±6.8	134.8±7.8	***
		アンズ	108.9±6.8	236.1±6.4	102.8±4.9	178.5±4.2	***
		スモモ	105.1±3.6	220.3±7.3	111.6±6.0	202.0±7.8	***
		ウメ	120.3±8.5	253.4±12.5	110.1±6.6	271.6±16.2	
		サクラ	118.0±6.9	228.9±9.0	117.8±6.1	220.7±7.8	
	ボケ属	ボケ	111.7±5.4	220.5±7.3	114.2±2.3	197.6±16.0	
		カリン	108.9±6.8	236.1±6.4	101.5±4.9	178.5±4.2	***
	サンザシ属	サンザシ	101.4±4.1	209.4±13.9	114.9±5.0	233.8±12.2	
	ビワ属	ビワ	106.7±3.3	226.7±7.1	101.5±4.9	201.3±7.1	*
	リンゴ属	リンゴ	106.7±3.4	226.7±7.2	101.2±5.5	116.4±5.1	***
マタタビ科	マタタビ属	ナシ属	106.7±3.5	226.7±7.3	106.4±5.7	187.1±7.3	***
		ナシ					
ミカン科	ミカン属	キウイフルーツ	115.3±3.1	226.5±8.0	115.3±6.8	172.6±8.1	***
		マタタビ	114.9±6.9	209.5±10.8	113.7±5.4	197.2±7.5	***
		オレンジ	101.5±13.7	215.4±5.3	115.4±6.1	255.0±14.0	
		ユズ	121.8±8.1	197.8±12.8	116.1±7.9	243.3±8.7	
		スダチ	105.1±3.6	220.3±7.3	111.2±6.7	208.2±4.6	
ブドウ科	ブドウ属	レモン	132.0±3.8	244.5±19.6	124.7±5.3	229.9±11.6	
		ブドウ	103.0±5.6	230.3±10.8	111.8±2.6	230.8±7.4	
		カキノキ属	122.2±8.9	232.5±5.4	120.9±7.7	204.7±5.6	**
		ザクロ属	119.0±6.3	236.4±8.0	120.0±7.7	211.8±11.6	
		ザクロ	122.2±8.9	232.5±5.4	118.4±3.0	262.2±9.6	
ツツジ科	スノキ属	クリ	100.9±6.3	233.0±11.0	112.0±6.0	177.4±11.2	***
		ブルーベリー	85.8±4.1	168.0±4.4	81.3±2.3	114.2±4.9	***
		スターアップル	108.2±4.9	218.1±7.7	110.0±4.3	189.9±8	*
		モンピン	136.1±6.4	255.7±20.4	128.0±4.7	258.2±10.5	
		オリーブ	103±5.6	230.3±10.8	114.6±8.4	220.3±8.8	

コントロール群：デンプン1,000 mg/kg + D.W.

サンプル投与群：デンプン1,000 mg/kg + サンプルMeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean ± S.E. \*\*\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs control

Table 3より、果樹の中でもバラ科に分類される植物の葉に血糖値上昇抑制作用を有するサンプルが多く含まれていることが示唆された。また、同じ属に分類される植物でも血糖値上昇抑制作用の強さがかなり異なることが示唆された。本研究では、サンプルの供給源が安定し、消費者が親しみやすいサンプルとして、バラ科の果樹の中で最も血糖値上昇抑制作用が強力であったモモの葉と、バラ科以外の果樹で血糖値上昇抑制作用が強力であったキウイフルーツの葉を選択してその作用と成分について研究した。なお、これらの果実の葉エキスの血糖値上昇抑制作用については5件(9サンプル)の特許を申請した。

## 第4章 キウイフルーツの血糖値上昇抑制作用

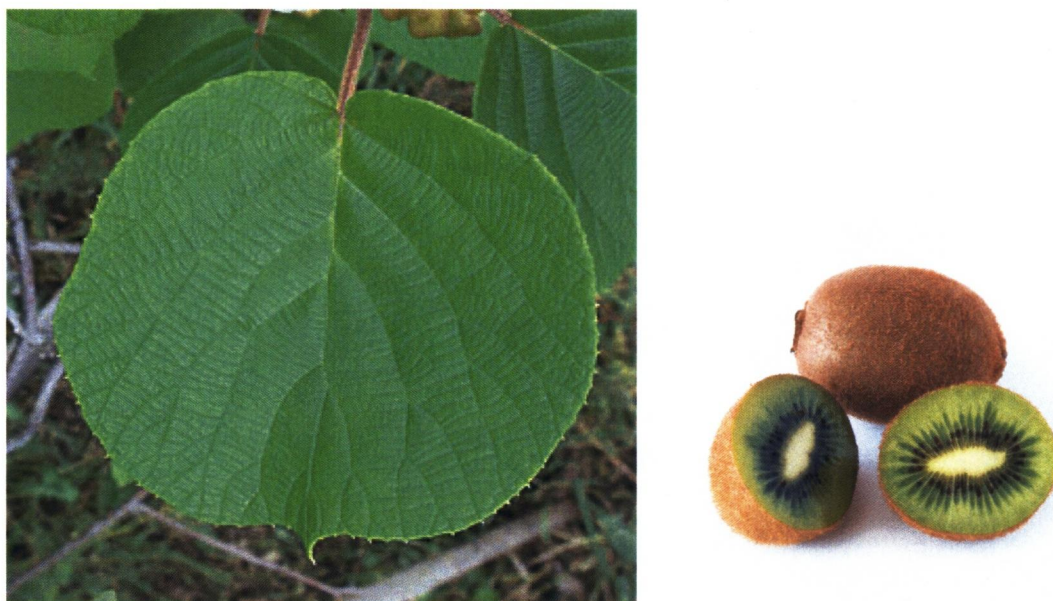


Fig. 14 キウイフルーツの葉（左）と果実（右）

### 4・1 キウイフルーツとは

キウイフルーツ（別名 シナサルナシ、オニマタタビ、学名：*Actinidia deliciosa*）とは、中国原産のマタタビ科（*Actinidiaceae*）マタタビ属（*Actinidia*）の落葉蔓性植物である。可食部の果実は市場価値が高く、ビタミンC<sup>40)</sup>と食物繊維<sup>41)</sup>が豊富である。葉は厚く、円形に近いハート型で果実と同様に表面が細かく硬い毛で覆われている。葉の大きさは成葉で直径20 cm程になり、冬季に葉は落葉する (Fig.14)。

キウイフルーツの機能性として、果実部分に脂質代謝改善効果、血栓溶解活性、メラニン生成抑制効果、血圧降下作用<sup>42)</sup>等が報告されている。また、漢方では葉部分は止血ややけど治療に用いられる。

### 4・2 キウイフルーツの葉エキス（以下、キウイ葉エキス）の調製

キウイフルーツの葉は、岡山県で8月～11月に採集した。採集したキウイフルーツの葉はそれぞれメタノール抽出、エタノール抽出、熱水抽出を行った。以下それぞれ、キウイ葉MeOHエキス、キウイ葉EtOHエキス、キウイ葉Waterエキスとした。また、キウイフルーツの枯葉は、1月に採集し、メタノール抽出、熱水抽出を行った。以下、キウイ枯葉MeOHエキス、キウイ枯葉Waterエキスとした。

#### 4・3 マウスを用いた糖質負荷試験におけるキウイ葉エキスの血糖値上昇抑制作用

食後の血糖値に与えるキウイ葉メタノール抽出エキス（以下、キウイ葉MeOHエキス）の作用をマウスにおける糖負荷試験で検討した。糖質として、多糖類のデンプン、二糖類のマルトースとスクロース、単糖類のグルコースの4種類を用いた。結果をFig.15に示した。コントロール群では、マウスへの糖負荷後30分時に血糖値は最大値を示し、その後血糖値は徐々に低下した。キウイ葉エキスをデンプン[A]またはスクロース[C]と同時に投与した場合、上昇する血糖値はキウイ葉エキスの代わりに蒸留水を投与したコントロール群と比較して糖負荷後30分時に有意に抑制された。一方、キウイ葉エキスをマルトース[B]またはグルコース[D]と同時に投与した場合には有意な血糖値上昇抑制作用を示さなかった。この時、単糖であるグルコース負荷試験において血糖値上昇を抑制した場合、すべての糖類の負荷試験において血糖値上昇が抑制されるはずであり、サンプルには小腸におけるグルコースの吸収阻害作用、インスリン様作用、インスリン分泌促進作用などが予測される。しかし、グルコースを負荷した場合には血糖値上昇が抑制されなかったことから、キウイ葉エキスの血糖値上昇抑制の作用メカニズムにはこれらの作用はなく、デンプンからオリゴ糖、二糖類から単糖類のように糖質を分解する糖質分解酵素の阻害活性があることが示唆された。Fig.15の結果から、キウイ葉エキスの作用メカニズムは、デンプンをオリゴ糖に加水分解する $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性とスクロースをグルコースとフルクトースに加水分解するスクラーゼ阻害活性があることが示唆された。

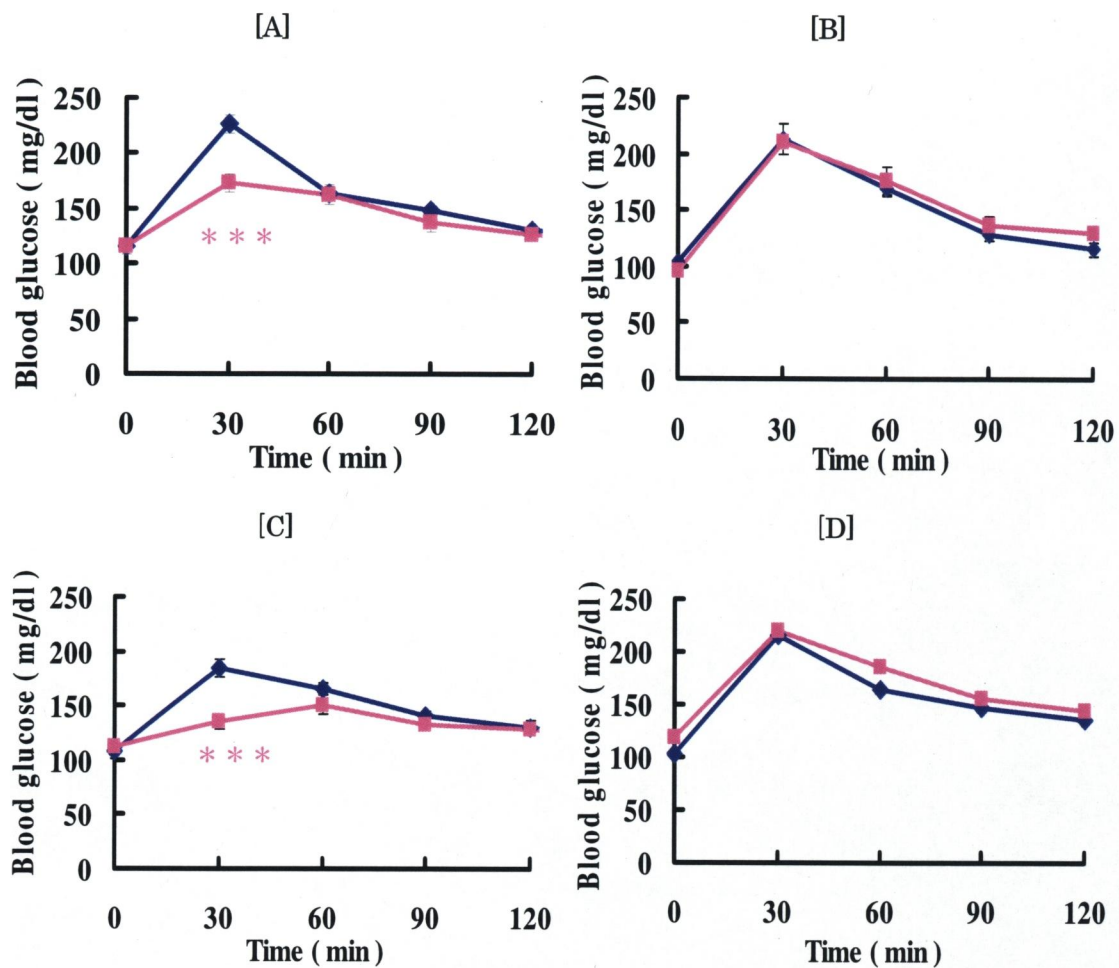


Fig. 15 マウスを用いた各種糖質負荷試験におけるキウイ葉エキスの血糖値上昇抑制作用

A : デンプン (1,000 mg/kg) 負荷試験      B : マルトース (1,000 mg/kg) 負荷試験

C : スクロース (2,000 mg/kg) 負荷試験      D : グルコース (1,000 mg/kg) 負荷試験

◆ : Control

■ : キウイ葉 MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control

#### 4・4 キウイ葉エキスの酵素阻害活性

$\alpha$  - アミラーゼとスクラーゼに対するキウイ葉エキス (0.01 - 200  $\mu\text{g/ml}$ ) の糖質分解酵素の阻害活性を *in vitro* 試験で確認した (Table 4)。キウイ葉エキスは濃度依存的に  $\alpha$  - アミラーゼ阻害活性を示し、 $\text{IC}_{50}$  値はキウイ葉MeOHエキスで17.1  $\mu\text{g/ml}$ 、キウイ葉Waterエキスで46.2  $\mu\text{g/ml}$  であった。また、スクラーゼ阻害活性も濃度依存的に示し、 $\text{IC}_{50}$  値はキウイ葉MeOHエキスで15.5  $\mu\text{g/ml}$ 、キウイ葉Waterエキスで54.6  $\mu\text{g/ml}$  であった。ポジティブコントロールとして用いたボグリボースの  $\alpha$  - アミラーゼ とスクラーゼ阻害活性の  $\text{IC}_{50}$  値はそれぞれ46.6  $\mu\text{g/ml}$  と0.07  $\mu\text{g/ml}$  であった。キウイ葉エキスは抽出溶媒に関係なくすべてのキウイ葉エキスで濃度依存的に酵素阻害活性を示したが、キウイ葉MeOHエキスはキウイ葉Waterエキスよりも約3～4倍高い酵素阻害活性を示した。ボグリボースのスクラーゼ阻害活性は試験したサンプルの中で最も強力であった。

Table 4 キウイ葉エキスの糖質分解酵素阻害活性

enzymes	$\text{IC}_{50}$ 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	キウイ葉		ボグリボース
	MeOHエキス	Waterエキス	
alpha-amylase	17.1	46.2	46.6
alpha-glucosidase (sucrase)	15.5	54.6	0.07

The inhibitory activities of Kiwi (0.01-200  $\mu\text{g/mL}$ ) on starch-hydrolyzing enzyme, alpha-amylase and sucrose-hydrolyzing enzyme, alpha-glucosidase were determined. Inhibitory activities were measured as described in Materials and Methods.

#### 4・5 血糖値上昇抑制作用を有する既存商品との比較

これまでの結果から、キウイ葉エキスは糖質分解酵素の活性を阻害することによる血糖値上昇抑制作用を有することが示唆された。そこで、ポジティブコントロールとして血糖値が気になり始めた方のための特定保健用食品として市販されている蕃爽麗茶から調製した蕃爽麗茶エキスを用いて検討を行った。結果をFig.16に示した。キウイ葉MeOHエキス投与群では糖負荷後30分にコントロール群と比較して有意に血糖値上昇を抑制したが、蕃爽麗茶エキス投与群では有意な血糖値上昇抑制作用を示さなかった。このことから、キウイ葉MeOHエキスは蕃爽麗茶よりも強力な血糖値上昇抑制作用があることが示唆され、血糖値上昇抑制作用を有する新規食品素材として有望であることが示唆された。

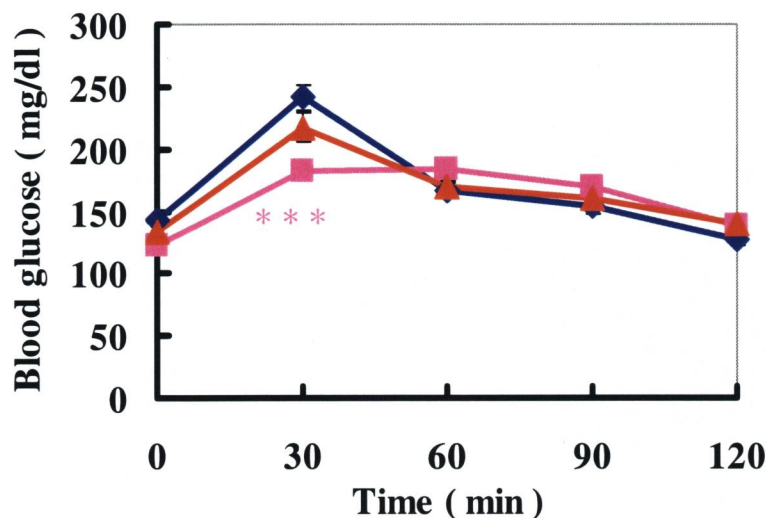


Fig.16 血糖値上昇抑制作用を有する既存商品との比較（デンプン負荷試験）

- ◆：デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )
  - ：デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg
  - ▲：デンプン 1,000 mg/kg + 蕃爽麗茶エキス 1,000 mg/kg
- Std : ddY mice, male, 6 W, n=6
- Data are expressed as mean ± S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control



#### 4・6 用量依存性の確認

マウスを用いた機能性素材の探索において、マウスと人における感受性の違いと、有用な活性成分を見逃さないために、一次スクリーニングでは、投与量を高めに設定することが多い。一方、将来的には人において効果があることが望ましいことから、マウスにおいてもより低用量で効果がある方が望ましいと考えられる。キウイ葉エキスには有意な血糖値上昇抑制作用があることから、マウスを用いた試験において、サンプル用量の検討を行った。用量には125 mg/kg～1,000 mg/kgを設定した。糖質にはデンプンを用いた。結果をFig.17に示した。キウイ葉エキスは125 mg/kg～1,000 mg/kgの全ての用量で、糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。また、用量依存的な血糖値上昇抑制作用を示した。

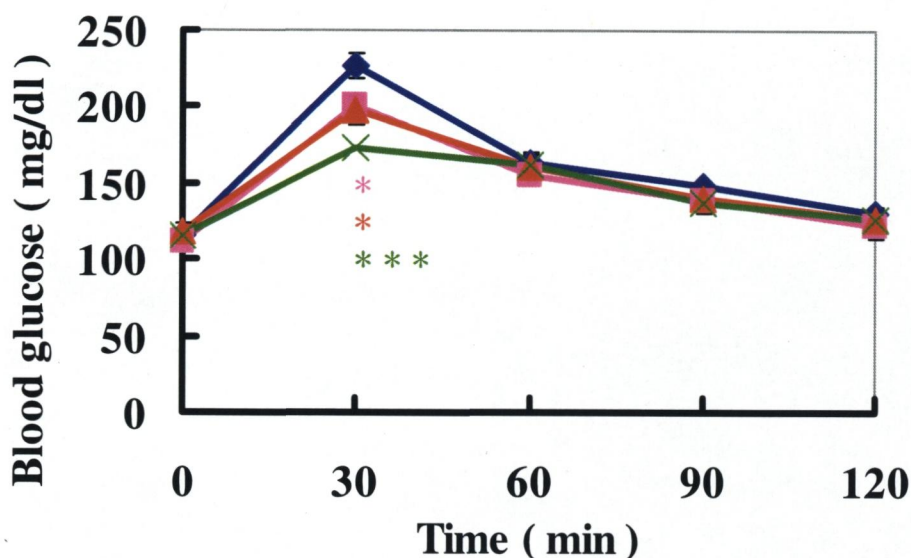


Fig.17 血糖値上昇抑制作用に及ぼすキウイ葉MeOHエキス用量の影響

- ◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )
- : デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス 250 mg/kg
- ▲ : デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス 500 mg/kg
- × : デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$  vs control

#### 4・7 抽出溶媒による検討

食品原料の製造においては基本的には水，エタノール以外の溶媒は使いにくいとされている。また，抽出効率を高めるために素材を粉碎したり，抽出時に加熱，加圧するなどの工夫も必要である。スクリーニングの時点では，サンプル調製時に上手く有効成分が抽出されていなかったために活性を見逃してしまうということも有り得るので，抽出方法も探索研究では重要なポイントである。ここでは，キウイ葉エキスが食品原料として使用できるかどうかを，抽出溶媒として，メタノール（収率7.3%），エタノール（収率10%），熱水（収率17%）を用いて検討した。糖質としてデンプンとスクロースを用いた。結果をFig.18に示した。この結果，抽出溶媒の異なる全てのキウイ葉エキ스로糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。このことから，キウイ葉エキ스는食品原料の製造の過程で使用可能な水やエタノールが使用でき，活性成分も抽出されることから食品原料として使用可能であることが示唆された。

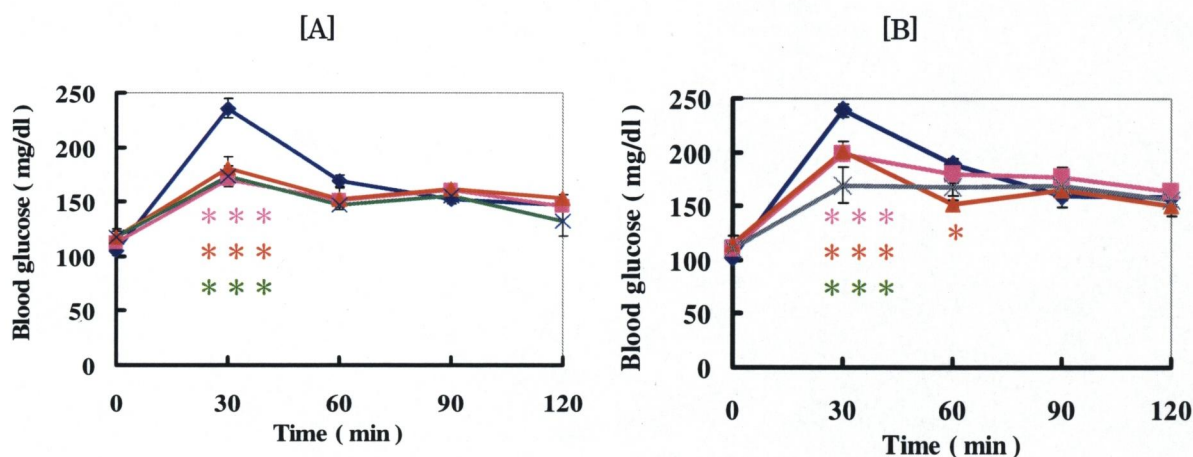


Fig.18 血糖値上昇抑制作用に及ぼすキウイ葉エキスの抽出溶媒の影響

A : デンプン負荷試験    B : スクロース負荷試験

◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W.    ( Control )

■ : デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス    1,000 mg/kg

▲ : デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉EtOHエキス    1,000 mg/kg

× : デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉Waterエキス    1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean ± S.E.    \*\*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$  vs control



#### 4・8 キウイエキス抽出部位による比較

キウイの葉には有用な血糖値上昇抑制作用があることが示唆された。このことから、葉以外の植物全体にも血糖値上昇抑制作用がある可能性が高い。ある限られた成分が血糖値上昇抑制作用に寄与すると仮定した場合、その成分が多い部位を抽出することにより、抽出効率が高まり、また、純度の高い物質が得られるため、葉などにも応用できると考えられる。ここでは、抽出部位として、葉（収率7.3%）、葉柄（収率1.4%）、実（収率8.6%）、実の皮（収率4.2%）、収穫前に大量に摘果され、廃棄物となる未熟な実（収率8.3%）のそれぞれのメタノール抽出物と溶媒を用いずそのまま凍結乾燥後、粉末にした実（収率10%）を用いた(Fig.19)。糖質としてデンプンとスクロースを用いた。結果はFig.20に示した。Fig.20[A]より、デンプン負荷試験ではキウイ葉MeOHエキスのみが糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制し、Fig.20[B]のスクロース負荷試験ではキウイ葉MeOHエキスとキウイ葉柄MeOHエキ스가糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。このことから、キウイ葉柄エキスにもキウイ葉エキス同様に血糖値上昇抑制作用を有する成分が含まれていることが示唆された。さらに、果実部位ではなく、あまり使用されてこなかった未利用資源である葉と葉柄に有用な血糖値上昇抑制作用があることが示唆された。また、キウイ葉柄はスクロース負荷試験においてのみ血糖値上昇抑制作用を示したことから、抽出部位により阻害する酵素（ここでは $\alpha$ -アミラーゼとスクラーゼ）が異なることが示唆された。



Fig.19 キウイの葉と葉柄

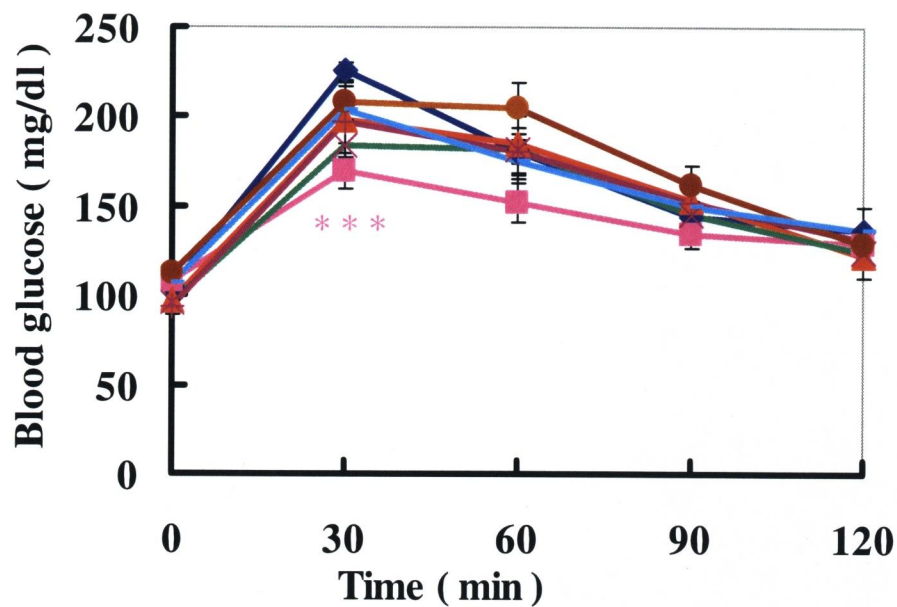


Fig.20 [A] 血糖値上昇抑制作用に及ぼすキウイ葉エキスの抽出部位の影響（デンプン負荷試験）

◆：デンプン 1,000 mg/kg + D.W. （ Control ）

■：デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

▲：デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉柄MeOHエキス 1,000 mg/kg

×：デンプン 1,000 mg/kg + キウイ皮MeOHエキス 1,000 mg/kg

＋：デンプン 1,000 mg/kg + キウイ実MeOHエキス 1,000 mg/kg

●：デンプン 1,000 mg/kg + キウイ摘果実MeOHエキス 1,000 mg/kg

◻：デンプン 1,000 mg/kg + キウイ凍結乾燥実MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std：ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean ± S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control

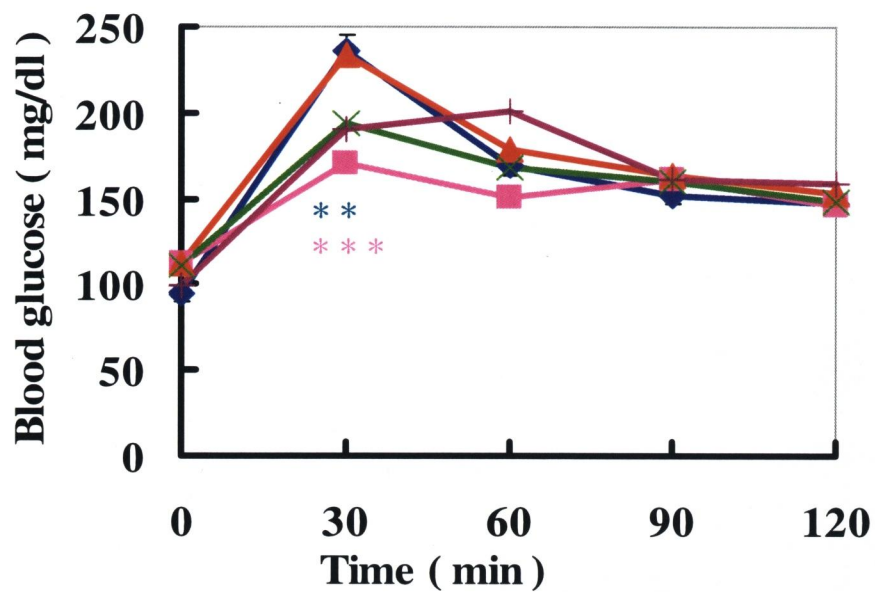


Fig.20[B] 血糖値上昇抑制作用に及ぼすキウイ葉エキスの抽出部位の影響(スクロース負荷試験)

◆ : スクロース 2,000 mg/kg + D.W. ( Control )

■ : スクロース 2,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

▲ : スクロース 2,000 mg/kg + キウイ皮MeOHエキス 1,000 mg/kg

× : スクロース 2,000 mg/kg + キウイ葉柄MeOHエキス 1,000 mg/kg

+ : スクロース 2,000 mg/kg + キウイ摘果される実MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p$  < 0.005, \*\* $p$  < 0.01 vs control

#### 4・9 近縁種の血糖値上昇抑制作用

キウイフルーツと同じマタタビ科マタタビ属の近縁種には、サルナシ(学名: *Actinidia arguta*) とマタタビ(学名: *Actinidia polygama*) がある。ここでは岡山県で採集したマタタビの葉のメタノール抽出物(マタタビ葉MeOHエキス)(収率8.0%)と埼玉県で市販されていたマタタビ葉を熱水抽出して得られたマタタビ葉Waterエキス(収率15%)を用いた。さらに、静岡県で採集したキウイ葉エキスの血糖値上昇抑制作用の有無を検討した。糖質にはデンプンとスクロースを用いた。結果をFig.21に示した。Fig.21[A]より、糖質としてデンプンを用いた場合、マタタビ葉MeOHエキス(岡山産)は糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。しかしながら、マタタビ葉Waterエキス(埼玉産)には血糖値上昇抑制作用は見られなかった。また、静岡県で採集した葉から調製したキウイ葉エキスは、MeOHエキス、Waterエキスともに血糖値上昇抑制作用は見られなかった。次に、Fig.21[B]より、糖質にスクロースを用いた場合、抽出溶媒や、採集場所に関わらず、マタタビ葉エキス、キウイ葉エキスともに糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。また、データは載せていないが、マタタビ葉Waterエキス(埼玉産)は糖質にマルトースとグルコースを用いた場合、キウイ葉エキスと同様に血糖値上昇抑制作用を示さなかった。このことから、キウイフルーツの近縁種であるマタタビにも糖質分解酵素の阻害活性による血糖値上昇抑制作用があることが示唆された。また、キウイ葉エキス(静岡産)では、糖質にスクロースを負荷したときのみ血糖値上昇抑制作用を示した。データは示していないが、同じ岡山県で採集したキウイの葉から調製したエキスでも同様にスクロース負荷試験でのみ血糖値上昇抑制作用を示すサンプルがあった。このことから、糖質にスクロースを用いた時のみ有効な血糖値上昇抑制作用の活性成分は安定してマタタビ科植物の葉に含有されているが、糖質にデンプンを用いた時に血糖値上昇抑制作用を有する活性成分は含有量が不安定であることが示唆された。原因としては季節による活性成分の量の違いや種の違いなどがまず考えられるがそのことを明確に示すデータが得られていないので今後検討する予定である。

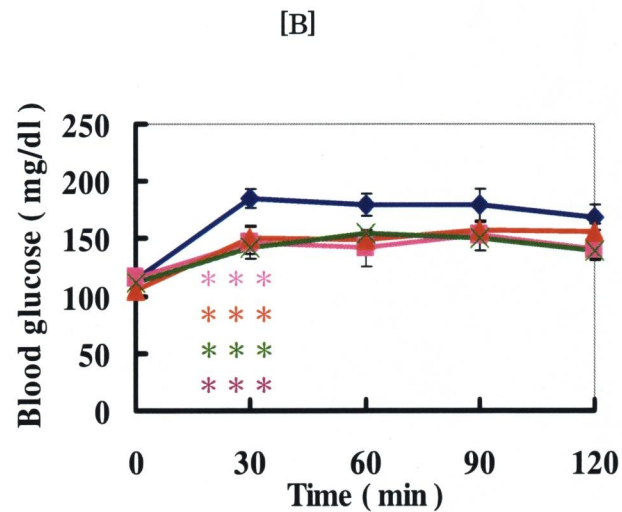
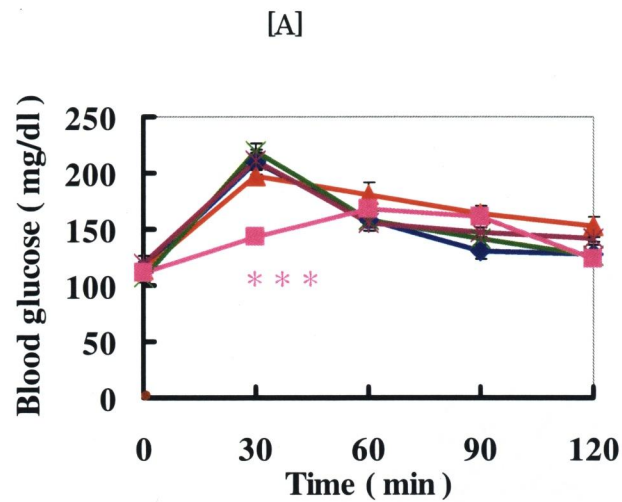


Fig.21 近縁種の血糖値上昇抑制作用

A : デンプン (1,000 mg/kg) 負荷試験 B : スクロース (2,000 mg/kg) 負荷試験

◆ : Control

■ : マタタビ葉MeOHエキス(岡山産) 1,000 mg/kg

▲ : マタタビ葉Waterエキス(埼玉産) 1,000 mg/kg

× : キウイ葉MeOHエキス(静岡産) 1,000 mg/kg

＋ : キウイ葉Waterエキス(静岡産) 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control



#### 4・10 キウイ枯葉エキスの血糖値上昇抑制作用

キウイフルーツの葉は冬季に緑色から褐色に変化し、落葉する。ここでは、葉が褐色に変化した枯葉（落葉した枯葉も含む）のメタノール抽出物（以下、キウイ枯葉MeOHエキス）の血糖値上昇抑制作用を検討した。糖質にはデンプンとスクロースを用いた。結果はFig.22に示した。この結果、スクロース負荷試験では、糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制したが、デンプン負荷試験では血糖値上昇抑制作用を示さなかった。データは示していないが、キウイ枯葉エキスの投与量を増やしてデンプン負荷試験を行ったところ、糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制したことから、キウイ枯葉エキスには、糖質にデンプンを負荷したときに血糖値上昇抑制作用を有する活性成分の含量が少ないことが示唆された。しかしながら、枯葉でも糖質にスクロースを用いた場合には、有意な血糖値上昇抑制作用を示すことから、枯葉も未利用資源の有効利用として活用できることが示唆された。

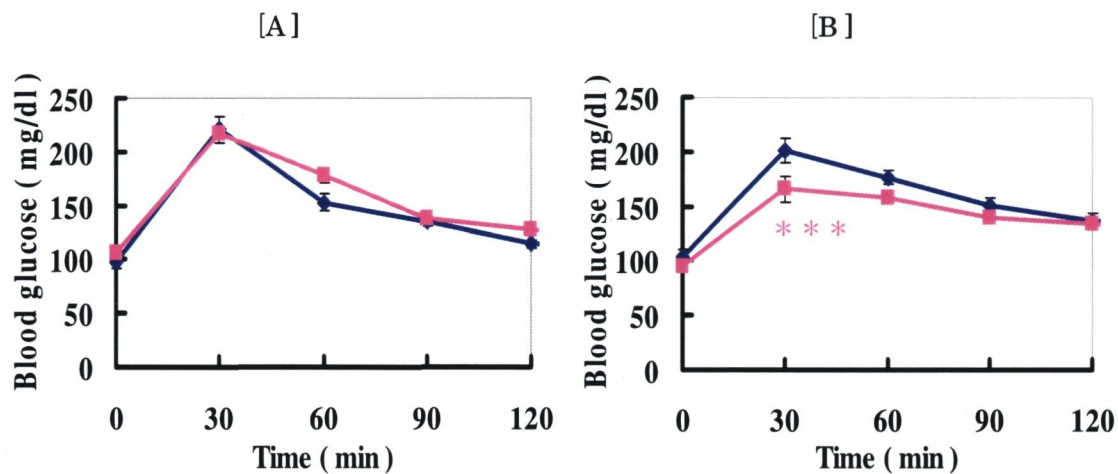


Fig.22 キウイ枯葉MeOHエキスの血糖値上昇抑制作用

A: デンプン (1,000 mg/kg) 負荷試験 B: スクロース (2,000 mg/kg) 負荷試験

◆ : Control

■ : キウイ枯葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control



#### 4・11 キウイ葉エキスの活性成分の分離①

以上の研究により、キウイ葉エキスには有意な血糖値上昇抑制作用があることから、次に血糖値上昇抑制作用を有する活性成分の分離を試みた。キウイ葉エキス（8 g）（収率7.3%）を600 mlの蒸留水(Water)に溶解させ、等量の酢酸エチル(EtOAc)を加え、Water①画分とEtOAc画分に分配した。この操作を3回繰り返した。Water①画分をエバポレーターで減圧濃縮後、同様の操作により、さらにWater②画分と*n*-BuOH画分に分配した。一方、EtOAc画分もエバポレーターで減圧濃縮後、90%MeOH画分と*n*-Hex画分に分配した。全ての画分をエバポレーターで減圧濃縮後、凍結乾燥し、重量を測定した。これらの分配操作により、Water②画分1.0 g、*n*-BuOH画分2.8 g、90% MeOH画分1.3 g、*n*-Hex画分2.6 gの4つの画分を得た(Fig.23)。

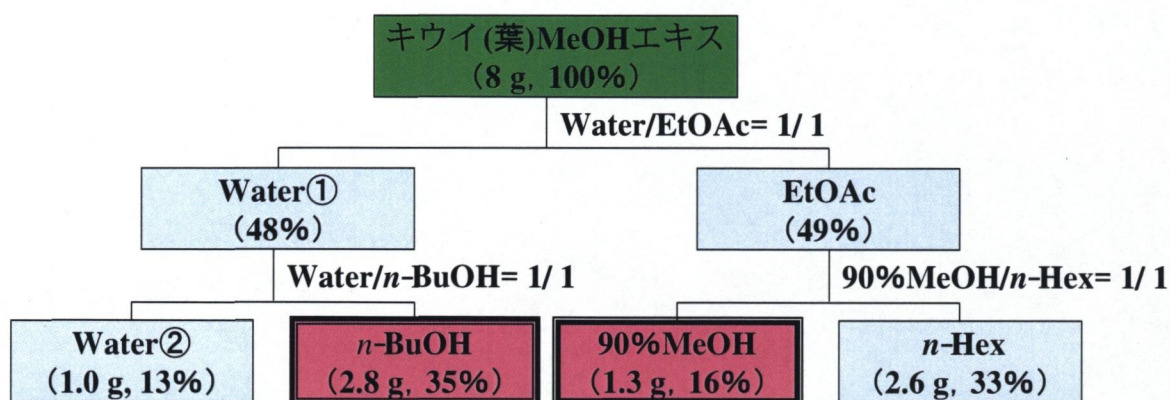


Fig.23 キウイ葉エキス活性成分の分離①

#### 4・12 キウイ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用

マウスを用いたキウイ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用をFig.24に示した。Fig.24 [A]のデンプン負荷試験では、*n*-BuOH画分（1,000 mg/kg）と90% MeOH画分（1,000 mg/kg）が糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。Fig.24[B]のスクロース負荷試験では*n*-BuOH画分が糖負荷後30分時に有意な血糖値上昇を抑制した。水②画分（1,000 mg/kg）ではこれら糖負荷試験における血糖値上昇抑制作用を示さなかった。また、データは示していないが、*n*-Hex画分も予備試験（*n*=6で2回）の糖負荷試験の結果から、これら糖負荷試験における血糖値上昇抑制作用を示さなかった。

このことから、90%MeOH画分には $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分が、*n*-BuOH画分には $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分とスクラーゼ阻害活性成分が含まれていることが示唆された。

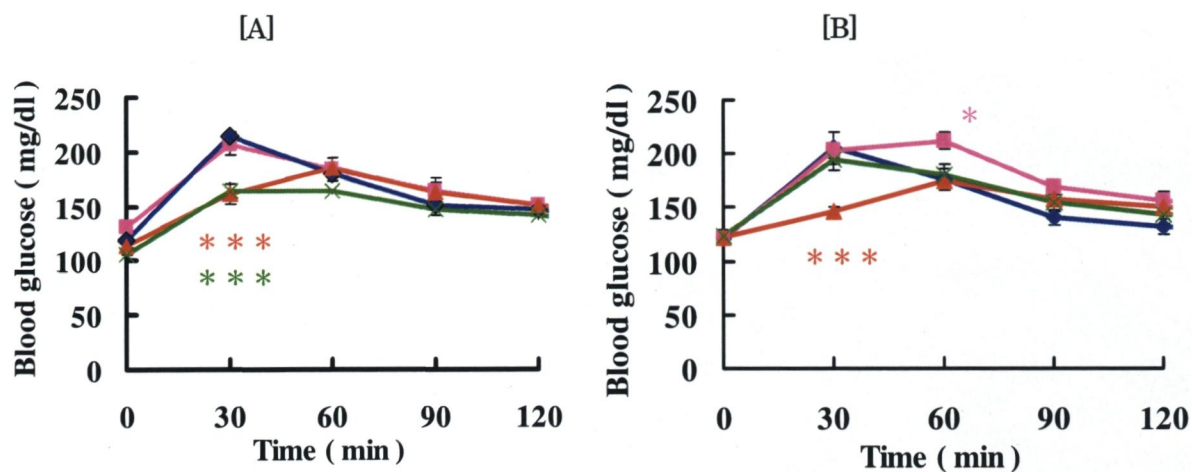


Fig. 24 キウイ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用

A : デンプン (1,000 mg/kg) 負荷試験

B : スクロース (2,000 mg/kg) 負荷試験

◆ : Control

■ : キウイ葉エキスWater②画分 1,000 mg/kg

▲ : キウイ葉エキスn - BuOH画分 1,000 mg/kg

× : キウイ葉エキス90%MeOH画分 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.005$  vs control

#### 4・13 キウイ葉エキス画分の *in vitro* 試験における酵素阻害活性

90%MeOH画分を $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験に、*n*-BuOH画分をスクラーゼ阻害活性試験にそれぞれ供した。結果はTable 5に示した。キウイ葉エキスの*n*-BuOH画分にはスクラーゼ阻害活性が、90%MeOH画分には $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性がそれぞれ確認された。IC<sub>50</sub>値はそれぞれ33.9  $\mu$ g/ml, 42.9  $\mu$ g/mlで、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性はポジティブコントロールとして用いたボグリボースと同程度であった。

Table 5 キウイ葉エキス画分の *in vitro* 試験における酵素阻害活性

enzymes	IC <sub>50</sub> values ( $\mu$ g/mL)		
	BuOH	90% MeOH	voglibose
alpha-amylase	ND	42.9	46.6
alpha-glucosidase	33.9	ND	0.07

ND: not detected.

The inhibitory activities of Kiwi fractions (0.01-200  $\mu$ g/mL) on starch-hydrolysing enzyme, alpha-amylase and sucrose-hydrolysing enzyme, alpha-glucosidase were determined. Inhibitory activities were measured as described in Materials and Methods.

#### 4・14 キウイ葉エキスの活性成分の分離②

Fig.22の結果から、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分を90%MeOH画分から、スクラーゼ阻害活性成分を*n*-BuOH画分から分離することを試みた。分離方法には各種クロマトグラフィーを用いた。

##### 4・14・1 キウイ葉エキスにある $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分の分離

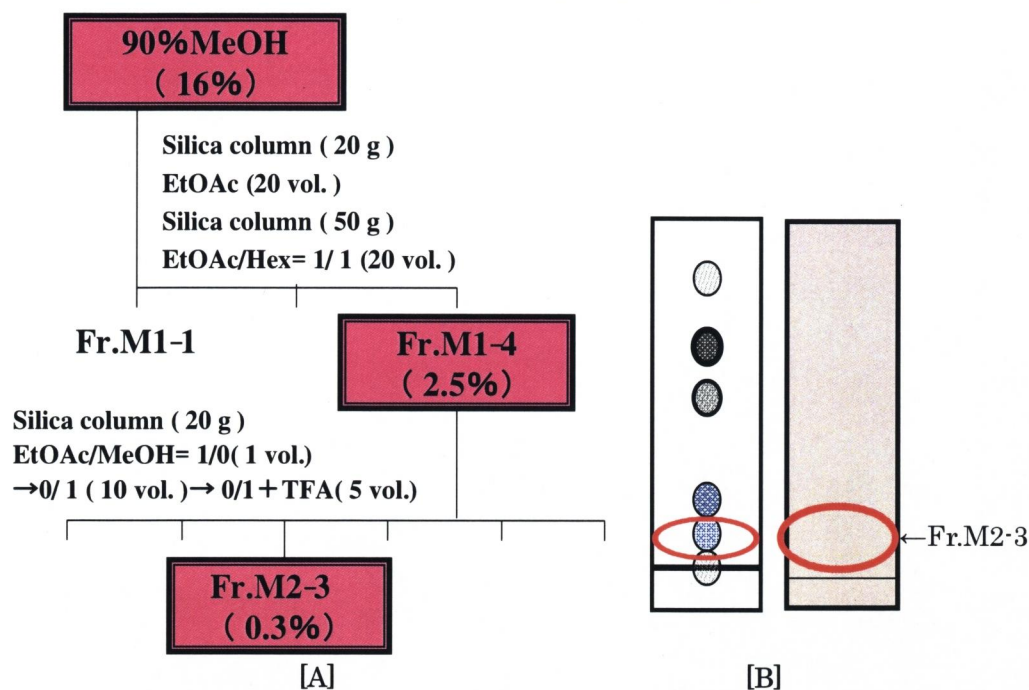


Fig.25 キウイ葉エキスにある $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分の分離

A : 分離スキーム      B : TLC (ODS MeOH : Water=4 : 1, アニスアルデヒド)

それぞれの段階で糖質にデンプンを用いた糖負荷試験を行い、活性成分を分離した(Fig.25[A])。最終的にTLC上での挙動の違いから、6つのFractionを得た(Fig.25[B])。このFraction荷試験の結果をFig.26に示した。Fr.M2-3が糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。このことからFr.M2-3がキウイ葉エキスの90%MeOH画分に含まれる $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分であることが示唆された。また結果は示していないが、この90%MeOH画分のFr.M1-1より、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分の一つとしてコロソリン酸を単離し、スペクトル分析により同定した。コロソリン酸は*in vitro*試験で $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を示したが、マウスにおけるデンプン負荷試験では血糖値上昇抑制作用を示さなかった。



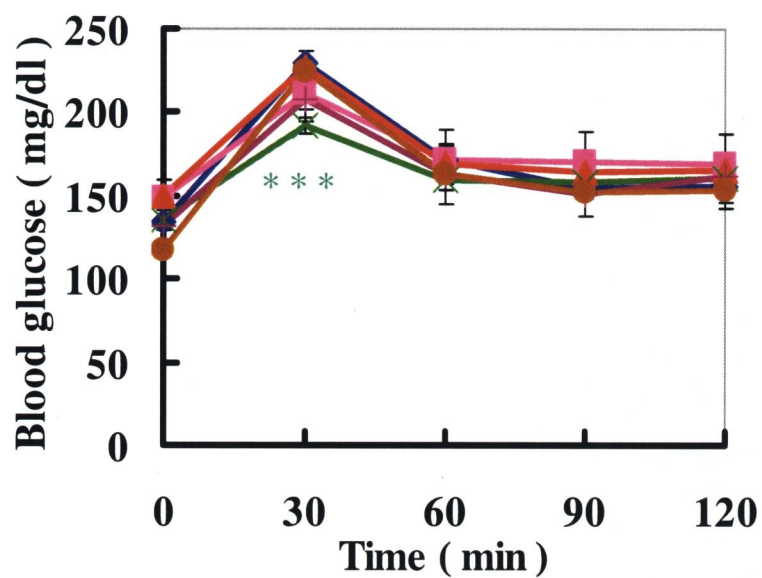


Fig.26 キウイ葉エキスFr.M2画分の血糖値上昇抑制作用

◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )

■ : デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス Fr.M2 - 1 1,000 mg/kg

▲ : デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス Fr.M2 - 2 1,000 mg/kg

× : デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス Fr.M2 - 3 1,000 mg/kg

+ : デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス Fr.M2 - 4 1,000 mg/kg

● : デンプン 1,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス Fr.M2 - 5 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control

\* 収率から1,000mg/kg相当になるように投与量を換算した。

#### 4・14・2 キウイ葉エキスにあるスクラーゼ阻害活性成分の分離

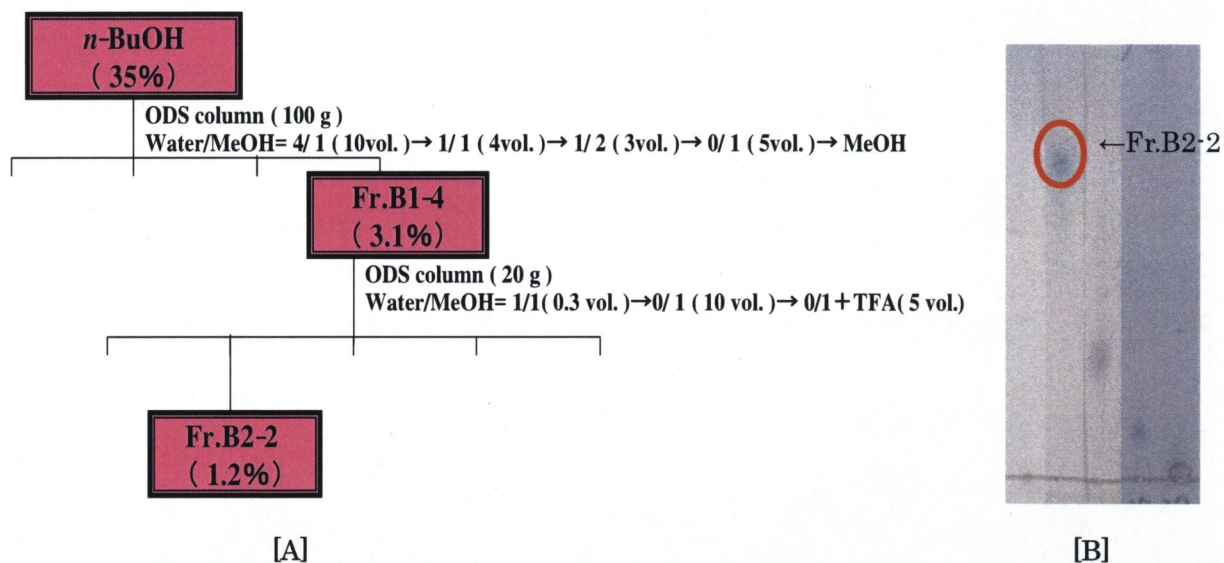


Fig.27 キウイ葉エキスにあるスクラーゼ阻害活性成分の分離

A:分離スキーム      B: TLC (ODS MeOH : Water=4 : 1, アニスアルデヒド)

それぞれの段階で糖質にスクロースを用いた糖負荷試験を行い、活性成分を分離した (Fig.27[A])。最終的にTLC上での挙動の違いから、5つのフラクションを得た (Fig.27[B])。このフラクションを用いたスクロース負荷試験の結果をFig.28に示した。Fr.B2 - 2が糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。このことからFr.B2 - 2がキウイ葉エキスの *n* - BuOH画分に含まれるスクラーゼ阻害活性成分であることが示唆された。



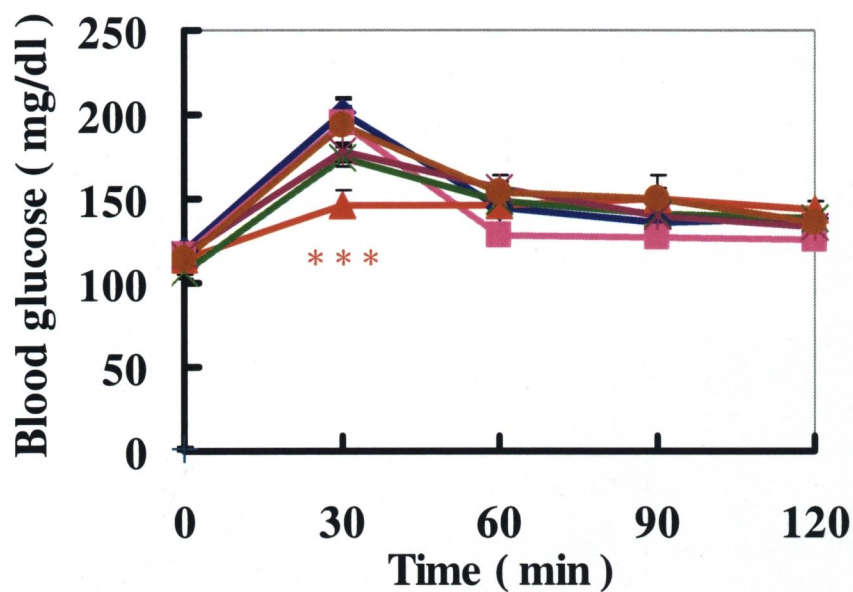


Fig.28 キウイ葉エキスFr.B2画分の血糖値上昇抑制作用

◆ : スクロース 2,000 mg/kg + D.W. ( Control )

■ : スクロース 2,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス Fr.B2 - 1 1,000 mg/kg

▲ : スクロース 2,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス Fr.B2 - 2 1,000 mg/kg

× : スクロース 2,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス Fr.B2 - 3 1,000 mg/kg

+ : スクロース 2,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス Fr.B2 - 4 1,000 mg/kg

● : スクロース 2,000 mg/kg + キウイ葉MeOHエキス Fr.B2 - 5 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control

\* 収率から1,000mg/kg相当になるように投与量を換算した。

これらの結果から、 $\alpha$  - アミラーゼ阻害活性を示す活性成分とスクラーゼ阻害活性を示す活性成分がそれぞれ異なることが示唆された。またFr.M2-3が $\alpha$  - アミラーゼ阻害活性成分でFr.B2-2がスクラーゼ阻害活性成分であることが示唆された。

#### 4・15 キウイ葉エキスの活性成分の構造解析

##### 4・15・1 キウイ葉エキスの $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分

マウス血糖値上昇抑制作用の見られた Fr.M2-3 は TLC 上で単一スポットとして確認されたため、NMR による分析を行った。測定したデータ ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY, HMQC, HMBC) は巻末の追補データに載せた。

$^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて特徴的なシグナルとして、オレフィン水素と考えられる 1 H 分のシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  5.12), 酸素と隣り合った炭素に結合する水素と考えられる 4 個の 1H 分のシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  3.80, 3.63, 3.54, 3.30) が観測された。また高磁場にはメチル基 (3H 分) と考えられる 1 個の二重線水素 ( $\delta_{\text{H}}$  0.88) と 5 個の単一線水素 ( $\delta_{\text{H}}$  1.13, 1.10, 0.98, 0.96, 0.83) のシグナルが観測された。また  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルおよび HMQC スペクトルより、1 個のカルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  207.8) の存在と 2 個のオレフィン炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  139.9, 126.5), 1 個のオキシメチレン炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  65.9), 4 個のオキシメチン炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  74.7, 67.0) の存在が示唆された。

これらの構造に関する情報に加え、COSY スペクトル、HMBC スペクトルの詳細な解析により、Fig.29 に示した部分構造を得た。現時点では構造の決定には至っていないが、スペクトルから推測される炭素数が 30 であることと、既知物質のケミカルシフトとの比較から活性物質はこれら部分構造を有するトリテルペン的一种であると推定している。

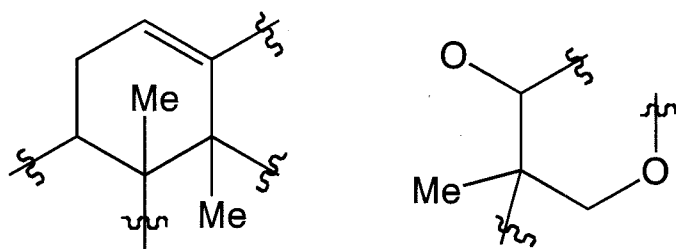


Fig.29 キウイ葉エキスの $\alpha$ -アミラーゼ阻害成分の推定部分構造

##### 4・15・2 キウイ葉エキスのスクラーゼ阻害活性成分

TLC 上で単一物質であると判断した Fr.B2-2 については、NMR 分析の結果から数種類の成分が混在しており、更に精製を要することが示された。今後、成分を単離したのちに解析を行う必要がある。

#### 4・16 キウイ葉エキスのコレステロール上昇抑制作用

キウイ葉エキスの血糖値上昇抑制作用があることが明らかとなったので、キウイ葉エキスの血糖値上昇抑制作用以外の生理作用があるかどうかを検討した。ここでは、血中コレステロール上昇抑制作用と血中トリグリセリド (TG) 上昇抑制作用をマウスを用いた脂質負荷試験で検討し、本項と次項に結果を示した。ポジティブコントロールとして黒烏龍茶エキスをを用いた。Fig.30にマウスを用いたキウイ葉エキスのコレステロール上昇抑制作用を示した。その結果、黒烏龍茶エキスは脂質投与後4時間目にコントロールと比較して有意にコレステロール上昇を抑制したが、モモ葉エキスはコレステロール上昇抑制作用を示さなかった。

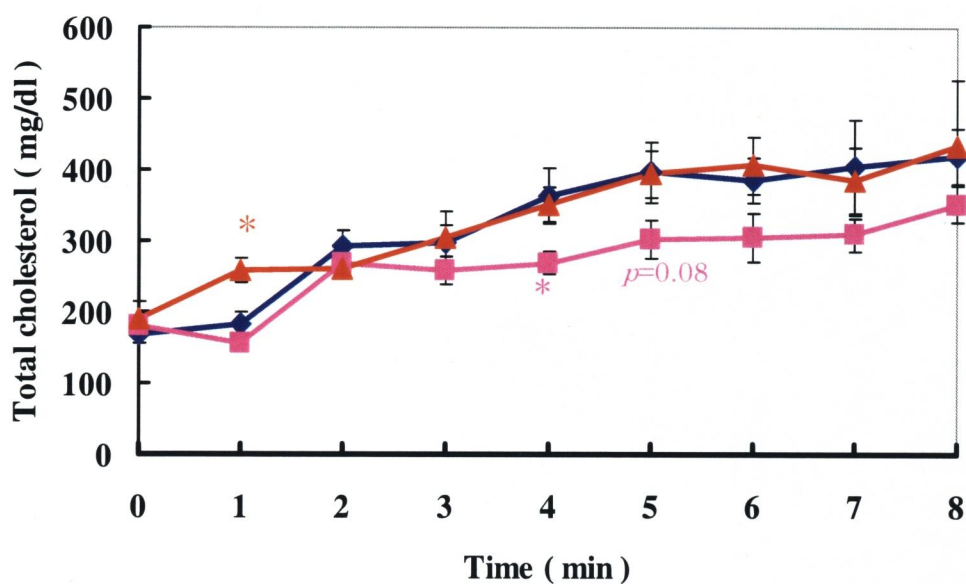


Fig.30 キウイ葉エキスのコレステロール上昇抑制作用

- ◆ : コレステロール懸濁液 + D.W. ( Control )
- : コレステロール懸濁液 + 黒烏龍茶エキス 1,000 mg/kg
- ▲ : コレステロール懸濁液 + キウイ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 7 W, n=6

Data are expressed as mean ± S.E. \* $p < 0.05$  vs control

#### 4・17 キウイ葉エキスのトリグリセリド上昇抑制作用

また、Fig.31にマウスを用いたキウイ葉エキスの血中トリグリセリド（TG）上昇抑制作用を示した。結果より、黒烏龍茶エキスは脂質投与後1～7時間目にコントロールと比較して有意にトリグリセリド上昇を抑制した。キウイ葉エキスはトリグリセリド上昇抑制作用を示さなかった。このことから、少なくとも、キウイ葉エキに含まれる血糖値上昇抑制作用を有する成分は、糖質分解酵素の阻害活性を有するが、コレステロールやトリグリセリドのような脂質の吸収阻害に関連する作用は示さないことが示唆された。

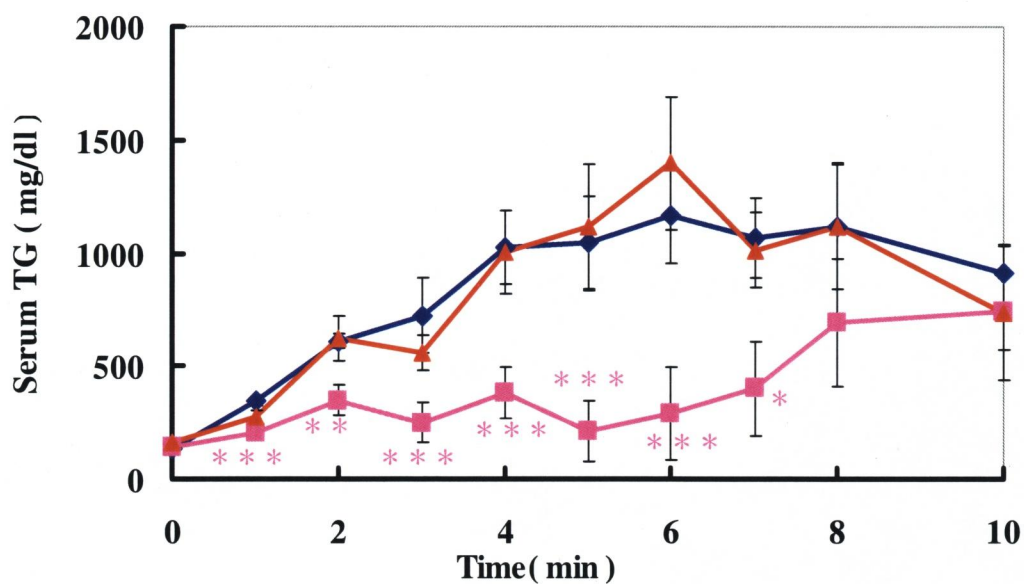


Fig.31 キウイ葉エキスのトリグリセリド上昇抑制作用

◆ : コレステロール懸濁液 + D.W. ( Control )

■ : コレステロール懸濁液 + 黒烏龍茶エキス 1,000 mg/kg

▲ : コレステロール懸濁液 + キウイ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 7 W, n=8

Data are expressed as mean ± S.E. \*\*\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs control

#### 4・18 まとめ

キウイの葉はこれまで果実収穫後にとくに利用されていなかった廃棄物であったが、今回の研究によりマウスでの血糖値上昇抑制作用、糖類分解酵素の阻害作用などの新たな機能性が示されたことから、その有効利用が提示されたと考えられる。キウイ葉エキスの血糖値上昇抑制作用に関わる作用メカニズムは糖質分解酵素である $\alpha$ -アミラーゼ活性を阻害する成分とスクラーゼを阻害する成分の二つの活性成分によるものであった。またこれら成分は、*n*-BuOH層と90% MeOH層に含有されており、水溶性と脂溶性の極性の異なる活性成分が含まれていることが明らかとなった。また、様々な検討試験の結果、活性成分は葉や葉柄に多く含有しており、可食部である実や皮は有意な血糖値上昇抑制作用を示さなかったことから活性成分の含量が少ないことが示唆された。このことは未利用資源である葉の有効利用の可能性を示したと考えられる。また、落葉して枯れた葉も血糖値上昇抑制作用を有する食品素材に十分使用できることがわかった。抽出溶媒も水やエタノールが使用できることから食品原料として使用できることも明らかとなった。これらのことから、キウイ葉エキスは血糖値上昇抑制作用を有する新規機能性食品としても広く応用できることが示唆された。産地や種の異なるキウイ葉エキスの血糖値上昇抑制作用の強さや活性成分の含有量の違いなどは今後検討する必要がある。また、効率の良い抽出方法なども検討する必要がある。



## 第5章 モモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用



Fig.32 モモの葉（左）と果実（右）

### 5・1 モモとは

モモ（学名 *Prunus persica* Batsch）とは、中国原産のバラ科（*Rosaceae*）・サクラ亜科（*Prunoideae*）の落葉小高木である。可食部の果実は市場価値が高い。

モモの葉は薄く、笹の葉に似た形で、果実と同様に甘い香りがする。葉の大きさは成葉で長径20 cm程になる。冬季に葉は落葉する（Fig.32）。

モモの果実部分は、食物繊維であるペクチンを多く含み、報告されている生理活性としては、コレステロール正常化作用（血液中のコレステロールの減少させて動脈硬化を防ぐ働き）や整腸作用（便秘予防）がある。糖尿病に関連する報告には、深井ら（2000）による培養細胞を使った実験で、モモの果実部分に糖・脂質代謝の活性化とインスリン感受性の上昇作用があると報告されている<sup>43)</sup>。モモの葉には収斂作用があるので、モモの葉エキスとして、入浴剤や化粧品に使用されている。

### 5・2 モモ葉エキスの調製

モモの葉は、岡山県で5月～11月に採集した。採集したモモの葉はそれぞれメタノール抽出、熱水抽出を行った。以下、それぞれモモ葉MeOHエキス、モモ葉EtOHエキス、モモ葉Waterエキスとした。



### 5・3 マウスを用いた各種糖質負荷試験におけるモモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用

食後の血糖値に与えるモモ葉エキスの作用をマウスにおける糖負荷試験で検討した。糖質として、多糖類のデンプン、二糖類のマルトースとスクロース、単糖類のグルコースの4種類を用いた。結果をFig.33に示した。コントロール群ではマウスへの糖負荷後30分時に血糖値は最大値を示し、その後血糖値は徐々に低下した。モモ葉MeOHエキスをデンプン[A]、マルトース[B]、スクロース[C]、グルコース[D]と同時に投与した場合、上昇する血糖値はモモ葉エキスの代わりに蒸留水を投与したコントロール群と比較して全ての糖質を用いた試験で糖負荷後30分時と60分時に有意に血糖値上昇を抑制した。このことから、モモ葉エキスの血糖値上昇抑制の作用メカニズムとして、デンプンからオリゴ糖、二糖類から単糖類のように糖質を分解する糖質消化酵素阻害作用、腸管におけるグルコース吸収阻害作用、インスリン様作用、インスリン分泌促進作用など、様々な可能性が考えられる。

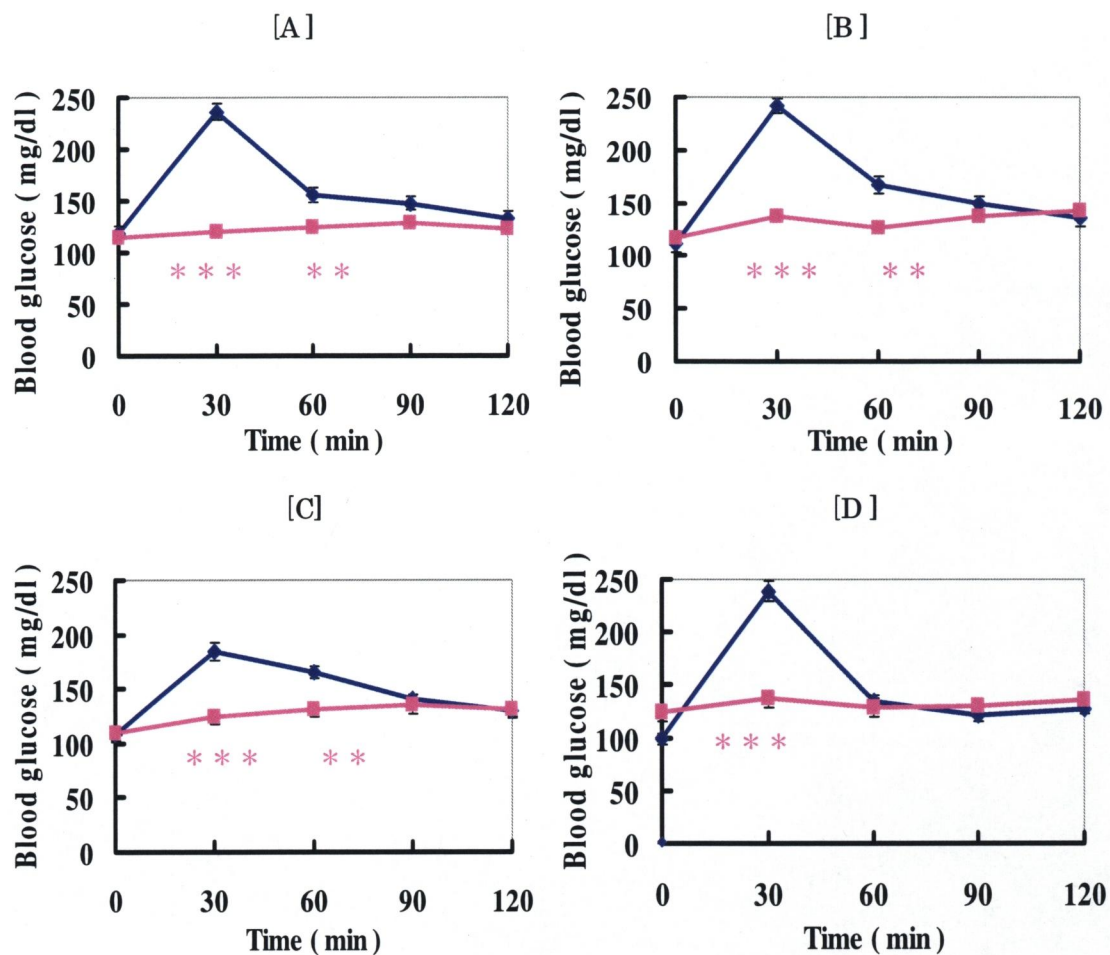


Fig.33 マウスを用いた各種糖質負荷試験におけるモモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用

A : デンプン (1,000 mg/kg) 負荷試験      B : マルトース (1,000 mg/kg) 負荷試験

C : スクロース (2,000 mg/kg) 負荷試験      D : グルコース (1,000 mg/kg) 負荷試験

◆ : Control

■ : モモ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.      \*\*\* $p < 0.005$ ,      \*\* $p < 0.01$  vs control

#### 5・4 モモ葉エキスの糖質分解酵素阻害活性

糖質分解酵素に対するモモ葉エキス（1 - 300  $\mu\text{g/ml}$ ）の酵素阻害活性の有無を *in vitro* 試験で検討した。モモ葉エキスは濃度依存的に  $\alpha$  - アミラーゼ阻害活性を示した。また、濃度依存的にマルターゼ阻害活性を示した。各酵素に対する  $\text{IC}_{50}$  値は Table 6 に示した。

Table 6 モモ葉エキスの糖質分解酵素阻害活性

enzymes	$\text{IC}_{50}$ 値 ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	モモ葉		ボグリボース
	MeOHエキス	Waterエキス	
alpha-amylase	20	3.1	46.6
alpha-glucosidase (sucrase)	30	13	0.07

The inhibitory activities of Peach (1-300  $\mu\text{g/mL}$ ) on starch-hydrolyzing enzyme, alpha-amylase and sucrose-hydrolyzing enzyme, alpha-glucosidase were determined. Inhibitory activities were measured as described in Materials and Methods.

### 5・5 モモの葉エキスの腸管におけるグルコース吸収阻害作用

次に、腸管におけるグルコースの吸収阻害作用の有無をマウスを用いた試験で検討した。血糖値変化の結果をFig.34[A]に示した。糖注入後30分時の血糖値はモモ葉エキスをグルコースと同時に投与した場合、モモ葉エキスの代わりに蒸留水を投与したコントロール群と比較して有意に血糖値上昇を抑制した。次に、腸管に投与したグルコース量を100%とした時に腸管から血中に吸収されずに腸管内に残存するグルコース量をFig.34[B]に示した。サンプル注入後30分時の腸管に残存したはモモ葉エキスをグルコースと同時に投与した場合、モモ葉エキスの代わりに蒸留水を投与したコントロール群と比較して有意に抑制した。このことから、モモ葉エキスは腸管から血中へのグルコース吸収を大幅に阻害することによって血糖値上昇を抑制し、この作用がモモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用の主な作用メカニズムであることが示唆された。

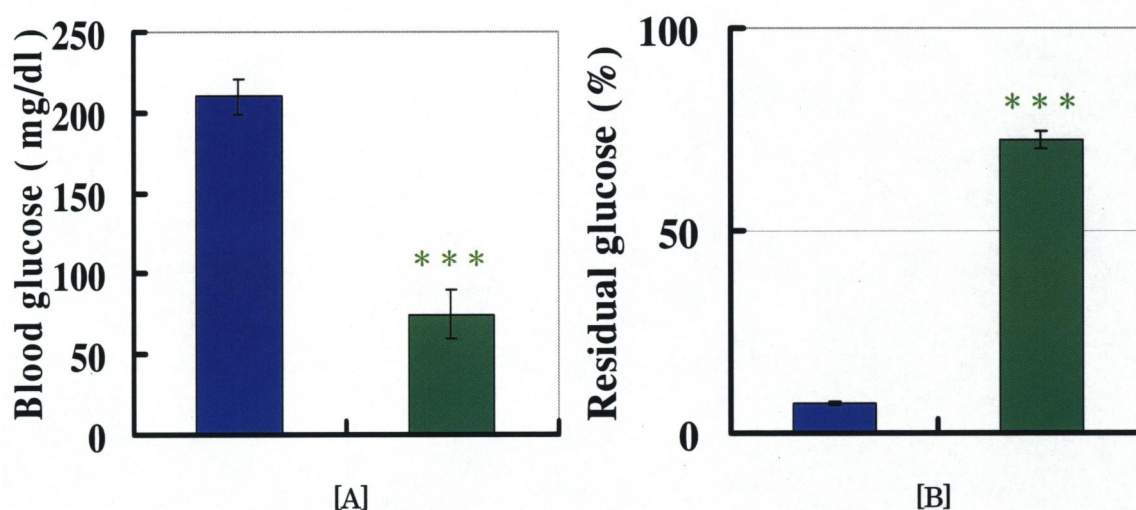


Fig. 34 モモの葉エキスの腸管におけるグルコース吸収阻害作用

A : グルコース (1,000 mg/kg) 負荷試験 B : 腸管におけるグルコースの残存率

■, ■ : Control

■, ■ : モモ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 7 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p$  < 0.005 vs control

## 5・6 血糖値上昇抑制作用を有する既存商品との比較

これまでの結果から、モモ葉エキスは有用な血糖値上昇抑制作用を有することが示唆された。ここで、ポジティブコントロールとして血糖値が気になり始めた方のための特定保健用食品として市販されている蓄爽麗茶から調製した蓄爽麗茶エキスを用いて検討を行った。結果をFig.35に示した。モモ葉MeOHエキス投与群では糖負荷後30分時にコントロール群と比較して有意に血糖値上昇を抑制したが、蓄爽麗茶エキス投与群では有意な血糖値上昇抑制作用を示さなかった。さらに、モモ葉エキスは糖負荷後60分時も有意に血糖値が低値を示した。モモ葉エキスの投与量は蓄爽麗茶の4分の1であるにも関わらず、糖負荷前と糖負荷後の血糖値の変化が少ないので、モモ葉エキスは蓄爽麗茶エキスよりも強力な血糖値上昇抑制作用があることが示唆され、血糖値上昇抑制作用を有する新規食品素材として有望であることが示唆された。

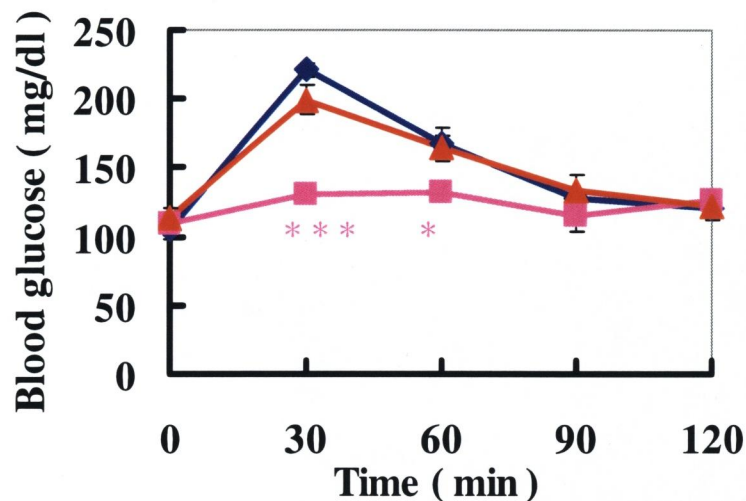


Fig.35 血糖値上昇抑制作用を有する既存商品との比較

◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )

■ : デンプン 1,000 mg/kg + モモ葉Waterエキス 500 mg/kg

▲ : デンプン 1,000 mg/kg + 蓄爽麗茶エキス 2,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p$  < 0.005, \* $p$  < 0.05 vs control



## 5・7 用量依存性の確認

マウスを用いた機能性素材の探索において、マウスと人における感受性の違いと、有用な活性成分を見逃さないために、一次スクリーニングでは、投与量を高めに設定することが多い。一方、将来的には人において効果があることが望ましいことから、マウスにおいてもより低用量で効果がある方が望ましいと考えられる。モモ葉エキスには有意な血糖値上昇抑制作用があることから、マウスを用いた試験において、サンプル用量の検討を行った。また、ポジティブコントロールとして、糖尿病患者の医薬品の有効成分であるボグリボースを用いてモモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用を検討した。用量には62.5 mg/kg～500 mg/kgを設定した。糖質にはデンプンを用いた。結果をFig.36に示した。モモ葉エキスでは62.5 mg/kg～500 mg/kgの全ての用量で、糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。また、用量依存的な血糖値上昇抑制作用を示した。ボグリボースも糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。この結果、モモ葉エキスは62.5 mg/kgより低用量で効果があり、顕著な血糖値上昇抑制作用があることが示唆された。ボグリボースの用量を考慮すると、モモ葉エキスは医薬品に匹敵する活性成分が含まれている可能性が示唆された。

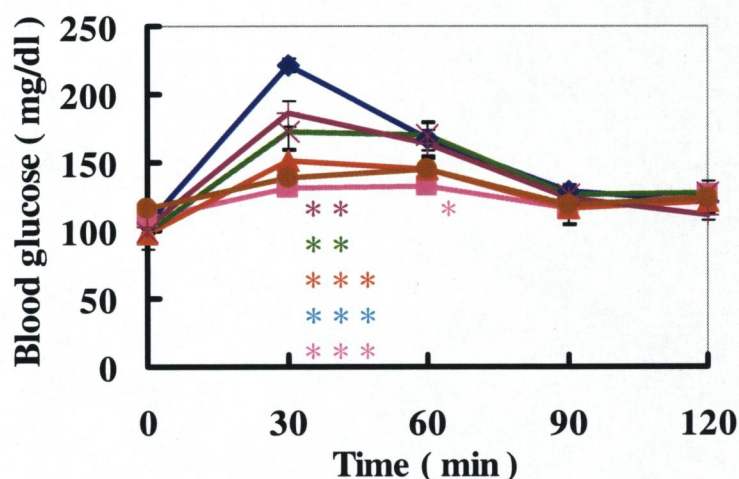


Fig.36 血糖値上昇抑制作用に及ぼすモモ葉MeOHエキス用量の影響

- ◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )
- : デンプン 1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス 500 mg/kg
- ▲ : デンプン 1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス 250 mg/kg
- × : デンプン 1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス 125 mg/kg
- +: デンプン 1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス 62.5 mg/kg
- : デンプン 1,000 mg/kg + ボグリボース 0.05 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p$ <0.005, \*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05 vs control

## 5・8 抽出溶媒による比較

食品原料の製造においては基本的には水、エタノール以外の溶媒は使いにくいとされている。また、抽出効率を高めるために素材を粉碎したり、抽出時に加熱、加圧するなどの工夫も必要である。スクリーニング時点では、サンプル調製時に上手く有効成分が抽出されていなかったために活性を見逃してしまうということも有り得るので、抽出方法も探索研究では重要なポイントである。ここでは、モモ葉エキスが食品原料として使用できるかどうかを、抽出溶媒として、メタノール(収率12%)、エタノール(収率10%)、熱水(収率30%)を用いて検討した。糖質としてデンプンとスクロースを用いた。結果をFig.37に示した。この結果、抽出溶媒の異なる全てのモモ葉エキスで糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。このことから、モモ葉エキスは食品原料の製造の過程で使用可能な水やエタノールが使用でき、活性成分も抽出されることから食品原料として使用可能であることが示唆された。

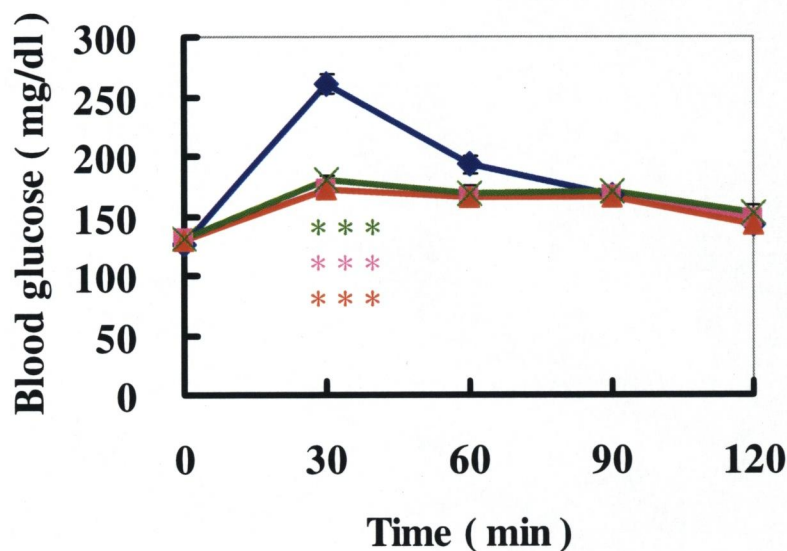


Fig.37 血糖値上昇抑制作用に及ぼすモモ葉エキスの抽出溶媒の影響

- ◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )
- : デンプン 1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス 500 mg/kg
- ▲ : デンプン 1,000 mg/kg + モモ葉EtOHエキス 500 mg/kg
- × : デンプン 1,000 mg/kg + モモ葉Waterエキス 500 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control



### 5・9 乾燥温度による比較

今回使用したモモの葉には水分が約60%含まれている。そのままアルコールや水で抽出してもよいが、抽出溶媒の量を考慮した場合、乾燥させて重量と容積を小さくした方が抽出効率がよいと思われる。また水分含量を減らすことにより、腐敗を遅延できる可能性が高い。また、実際に商品化する際、お茶等の飲料や菓子等への加工による熱の影響を考慮する必要がある。ここでは食品として飲料(お茶)を想定し、血糖値上昇抑制作用を有する活性成分の熱に対する安定性を検討した。抽出条件には熱水抽出を用いた。乾燥温度に70℃(収率30%)、100℃(収率32%)、150℃(収率21%)、200℃(収率17%)で処理したサンプルを用いた。Fig.38に各温度で処理したモモ葉乾燥物の状態を示した。乾燥温度が低いほどエキ스에甘い香りが残存し、甘い味がした。200℃もの高温の乾燥温度では、モモ葉乾燥物は墨になり、そのエキ스는苦い香りと味がした。

デンプン負荷試験を行い、各サンプルの血糖値上昇抑制作用を調べた結果をFig.39に示した。全てのサンプルで糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。収率とサンプル投与量を考慮すると、乾燥温度が高くなるほど抽出効率が悪くなったが、活性成分は200℃という高温の乾燥温度であっても血糖値上昇抑制作用を保持していることが示唆された。このことから、食品として応用する際、様々な加熱処理が適応できることが示唆された。

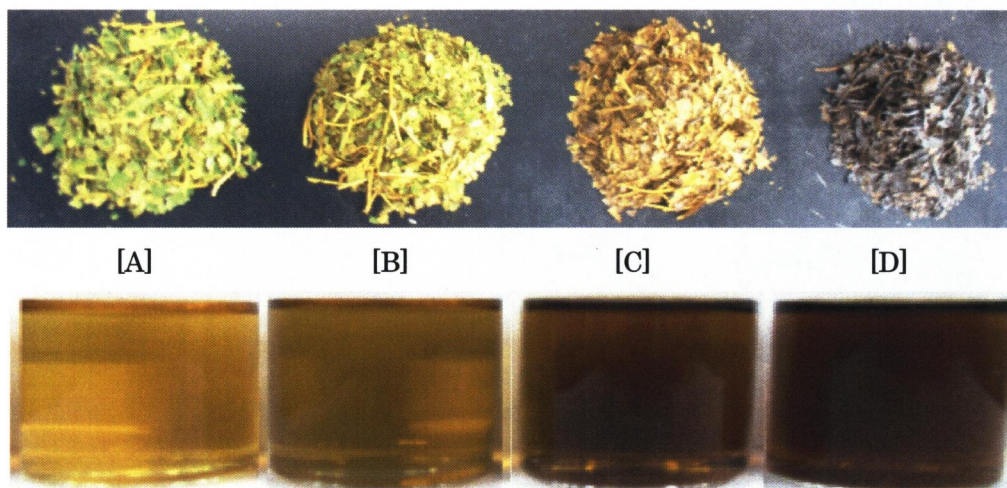


Fig.38 血糖値上昇抑制作用に及ぼすモモ葉エキスの乾燥温度の影響

A : 70℃ B : 100℃ C : 150℃ D : 200℃で乾燥させたモモの葉乾燥物(上)と  
その熱水抽出エキス(下)

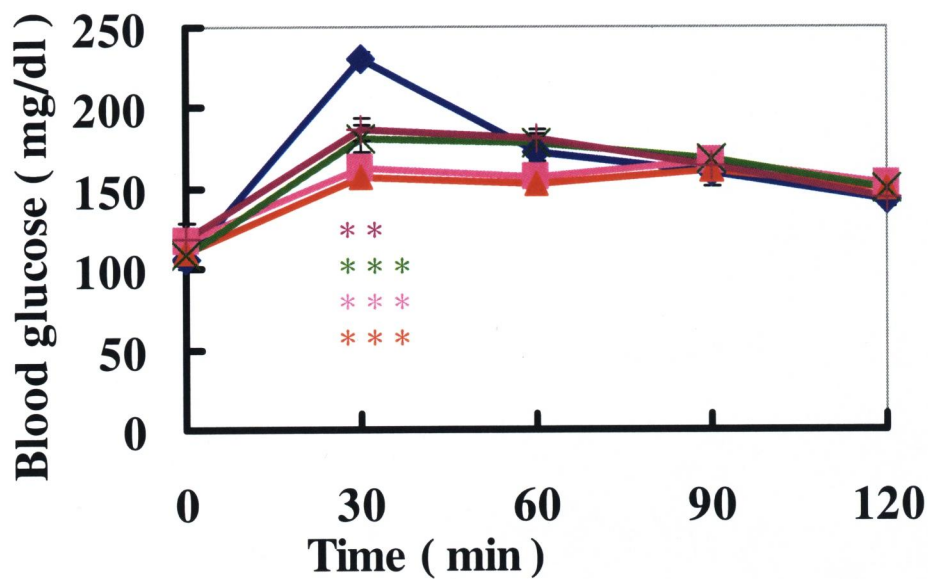


Fig.39 血糖値上昇抑制作用に及ぼすモモ葉エキスの乾燥温度の影響

- ◆ : デンプン1,000 mg/kg + D.W. ( Control )
- : デンプン1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス 70℃乾燥 1,000 mg/kg
- ▲ : デンプン1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス 100℃乾燥 1,000 mg/kg
- × : デンプン1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス 150℃乾燥 1,000 mg/kg
- + : デンプン1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス 200℃乾燥 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p$  < 0.005, \*\* $p$  < 0.01 vs control

#### 5・10 品種の異なるモモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用

本研究では、モモの品種として「清水白桃」を用いて研究を進めたが、その他の品種として、「紅清水白桃」と「川中島白桃」と「黄金桃」の血糖値上昇抑制作用を検討した。全て岡山県の同じ場所で採集した。糖質にはデンプンを用いた。ここでは糖負荷後30分間に上昇したコントロール群の血糖上昇値(30分時血糖値－0分時血糖値)を100%とし、品種の異なるモモ葉エキスの血糖上昇率(%)を算出し、比較した。結果をTable 7に示した。全ての品種のモモ葉エキスを糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。このことから、品種の違いに関わらず、モモの葉には有意な血糖値上昇抑制作用があることが示唆された。

Table 7 品種の異なるモモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用

	モモ葉 MeOH エキス			
	清水白桃	白麗	川中島白桃	黄金桃
血糖上昇率(%)	13.0±7.6***	21.0±3.4***	18.5±8.7***	26.6±7.3***

デンプン(1,000 mg/kg)負荷試験(サンプル投与量：1,000 mg/kg)を行い、糖負荷後30分間に上昇した血糖値をコントロール群と比較して%で示した。

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean ± S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control



## 5・11 モモエキスの抽出部位による比較

モモの葉には血糖値上昇抑制作用があることが示唆されたことから、葉以外の植物全体に血糖値上昇抑制作用がある可能性が高い。また、ある限られた成分が血糖値上昇抑制作用に寄与すると仮定した場合、その成分が多い部位を抽出することにより、抽出効率が高まり、また、純度の高い物質が得られるため、葉などにも応用できると考えられる。ここでは、抽出部位として、葉（収率12%）、果実の可食部（収率6.4%）、食用にはならない収穫前に大量に摘果される未熟な果実（収率8.7%）のそれぞれのメタノール抽出物と溶媒を用いずそのまま凍結乾燥後、粉末にした果実の可食部（収率10%）を用いた。糖質としてデンプンを用いた。結果はFig.40に示した。モモの葉エキスは糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制し、そのほかの部位は血糖値上昇抑制作用を示さなかった。また、糖負荷後30分時の血糖値は果実の糖分のためにコントロールよりも上昇した。これらのことから、モモの果実には有意な血糖値上昇抑制作用を有する成分の含量が少ないか、含有されていないことが示唆された。今回の試験結果から、食品としてはまだ十分に利用されていない資源であるモモ葉エキスに血糖値上昇抑制作用を有する成分が多く含有されていることが示唆された。

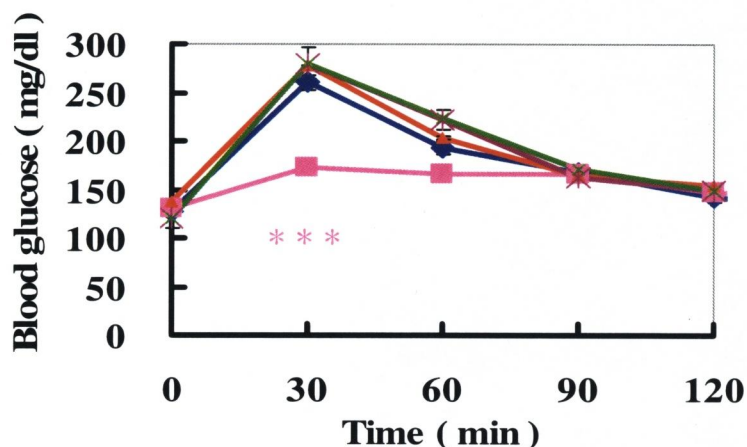


Fig.40 血糖値上昇抑制作用に及ぼすモモ葉エキスの抽出部位の影響

- ◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )
- : デンプン 1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス 500 mg/kg
- ▲ : デンプン 1,000 mg/kg + モモ未熟実MeOHエキス 500 mg/kg
- × : デンプン 1,000 mg/kg + モモ実MeOHエキス 500 mg/kg
- ＋ : デンプン 1,000 mg/kg + モモ実凍結乾燥エキス 500 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean ± S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control

## 5・12 近縁種の血糖値上昇抑制作用

近縁種として、モモと同じサクラ属(アンズ)、ボケ属(ボケ、カリン)、ビワ属(ビワ)、ナシ属(ナシ)、リンゴ属(リンゴ)の血糖値上昇抑制作用を検討した。抽出溶媒にはメタノールを使用し、糖質にはデンプンを用いた。結果をFig.41[A], [B] に示した。この結果、多くのサンプルで糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。中でもカリンやリンゴはモモの次に強い血糖値上昇抑制作用があることが示唆された。しかしながら、同じバラ科の果樹でも有意な血糖値上昇抑制作用を示さないサンプルもあった。また、リンゴは一過性の血糖値上昇抑制作用を示すなど、同じバラ科の果樹でも血糖値上昇抑制作用の強さが異なることが示唆された。これらの原因として、サンプルに含有している血糖値上昇抑制作用を有する活性成分の量と数が異なること、収穫場所の環境(土地、季節)の違いによる植物体の成分の違い、葉の形が薄いものから厚いものまであることから、抽出効率の違いなど様々なことが示唆された。これらのことから、同じバラ科の果樹でも、いくつか異なる血糖値上昇抑制作用を有する活性成分が見つかる可能性は高い。また、含有している活性成分の違いから、阻害する糖質分解酵素の違い、作用メカニズムの違い、作用の大きさ・作用時間の違いなど、多様性がある可能性が高く、様々な用途に使用できることが示唆された。

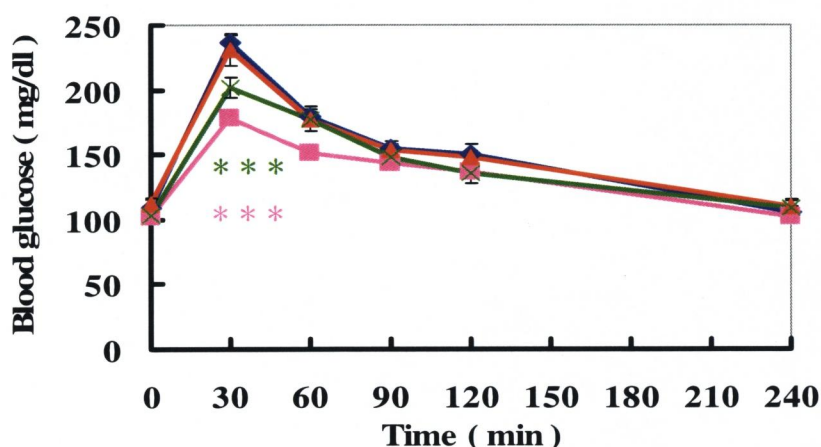


Fig.41 [A] バラ科果樹近縁種の血糖値上昇抑制作用

- ◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )
- : デンプン 1,000 mg/kg + カリン葉MeOHエキス 1,000 mg/kg
- ▲ : デンプン 1,000 mg/kg + ボケ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg
- × : デンプン 1,000 mg/kg + アンズ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control

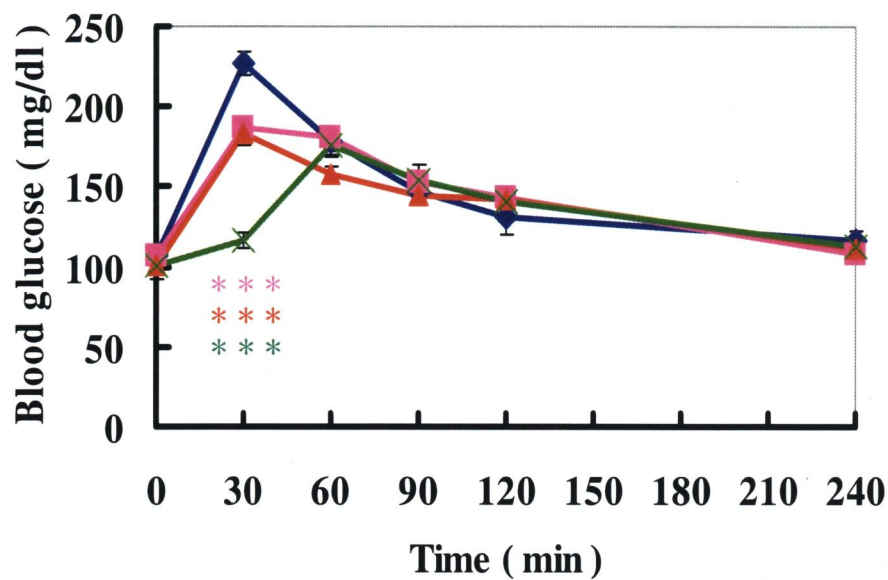


Fig.41 [B] 近縁種の血糖値上昇抑制作用

◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )

■ : デンプン 1,000 mg/kg + ナシ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

▲ : デンプン 1,000 mg/kg + ビワ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

× : デンプン 1,000 mg/kg + リンゴ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control

#### 5・13 近縁種の抽出部位による比較

モモと同じバラ科の果樹の葉には血糖値上昇抑制作用があることが示唆された。このことから、葉以外の植物全体に血糖値上昇抑制作用がある可能性が高い。また、ある限られた成分が血糖値上昇抑制作用に寄与すると仮定した場合、その成分が多い部位を抽出することにより、抽出効率が高まり、また、純度の高い物質が得られるため、葉などにも応用できると考えられる。Fig.41[A], [B]より、同じバラ科の果樹の葉でも血糖値上昇抑制を有する活性成分が異なることが考えられるので、ここでは、ウメ(バラ科サクラ属)、スモモ(バラ科サクラ属)、リンゴ(バラ科リンゴ属)、ナシ(バラ科ナシ属)、カリン(バラ科ボケ属)を用いて検討した。抽出部位には実、実の皮、種等を用いた。また、果樹ではないが、バラ科の花類であるバラ(バラ科バラ属)を用いて検討した。

Fig.42[A], [B]の結果より、バラの花、葉、茎とカリンの種が糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。一方、実や皮は有意な血糖値上昇抑制作用を示さなかった。これらのことから、果実部位ではなく、食用としてあまり使用されてこなかった未利用資源である葉や種や花にも有用な血糖値上昇抑制作用があることが示唆された。

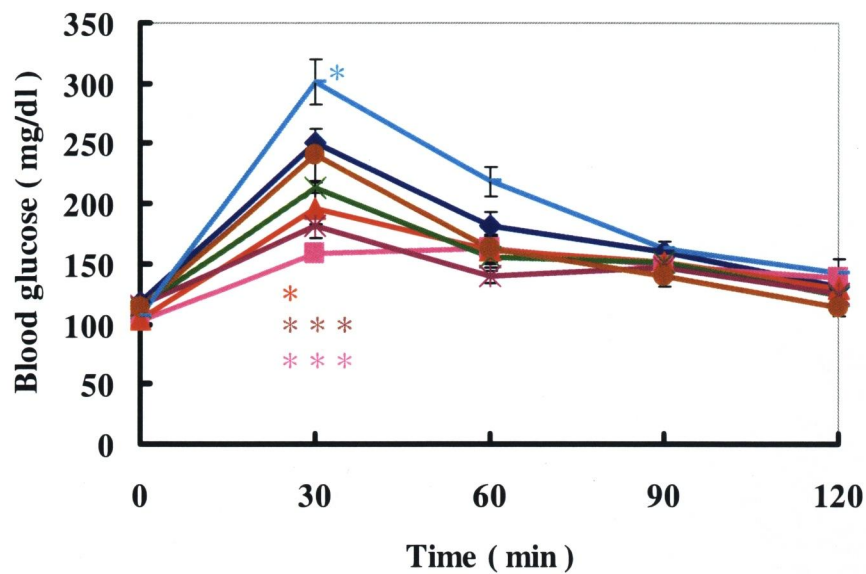


Fig.42[A] 近縁種の抽出部位による比較

- ◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )
- : デンプン 1,000 mg/kg + バラ花MeOHエキス 1,000 mg/kg
- ▲ : デンプン 1,000 mg/kg + バラ葉・茎MeOHエキス 1,000 mg/kg
- × : デンプン 1,000 mg/kg + カリン皮MeOHエキス 1,000 mg/kg
- ＋ : デンプン 1,000 mg/kg + カリン種MeOHエキス 1,000 mg/kg
- : デンプン 1,000 mg/kg + ナシ皮MeOHエキス 1,000 mg/kg
- : デンプン 1,000 mg/kg + リンゴ皮MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean ± S.E. \*\*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$  vs control



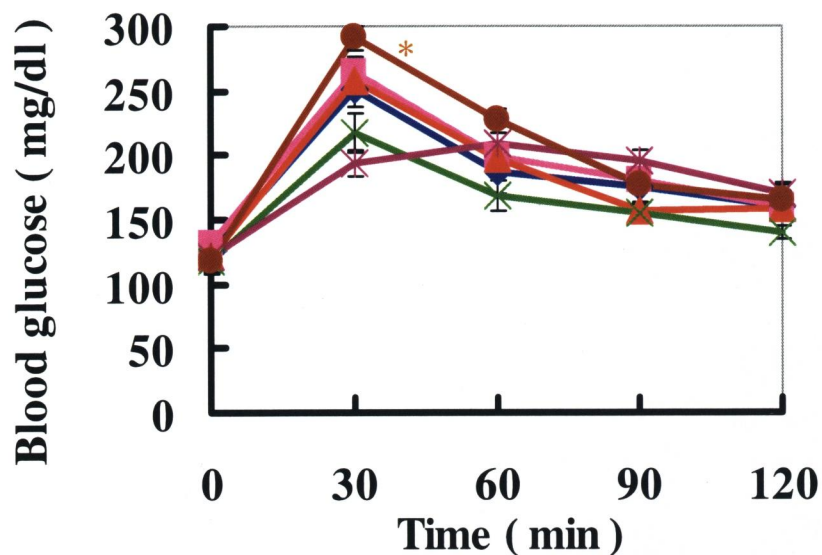


Fig.42[B] 近縁種の抽出部位による比較

- ◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )
- : デンプン 1,000 mg/kg + スモモ実MeOHエキス 1,000 mg/kg
- ▲ : デンプン 1,000 mg/kg + リンゴ実MeOHエキス 1,000 mg/kg
- × : デンプン 1,000 mg/kg + リンゴ実凍結乾燥エキス 1,000 mg/kg
- ＋ : デンプン 1,000 mg/kg + ナシ実MeOHエキス 1,000 mg/kg
- : デンプン 1,000 mg/kg + ウメ実MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \* $p < 0.05$  vs control

#### 5・14 モモ葉エキスの活性成分の分離①

以上の研究から、モモ葉エキスには有意な血糖値上昇抑制作用があることから、次に血糖値上昇抑制作用を有する活性成分の分離を試みた。モモ葉MeOH抽出エキス（15.2 g）（収率12%）を1.5 Lの蒸留水(Water)に溶解させ、等量の酢酸エチル(EtOAc)を加え、Water①画分とEtOAc画分に分配した。この操作を3回繰り返した。Water①画分をエバポレーターで減圧濃縮後、同様の操作により、さらにWater②画分と*n*-BuOH画分に分配した。一方、EtOAc画分もエバポレーターで減圧濃縮後、90% MeOH画分と*n*-Hex画分に分配した。全ての画分をエバポレーターで減圧濃縮後、凍結乾燥し、重量を測定した。これらの分配操作により、Water②画分7.0 g、*n*-BuOH画分4.2 g、90% MeOH画分 2.0 g、*n*-Hex画分1.6 gの4つの画分を得た(Fig.43)。

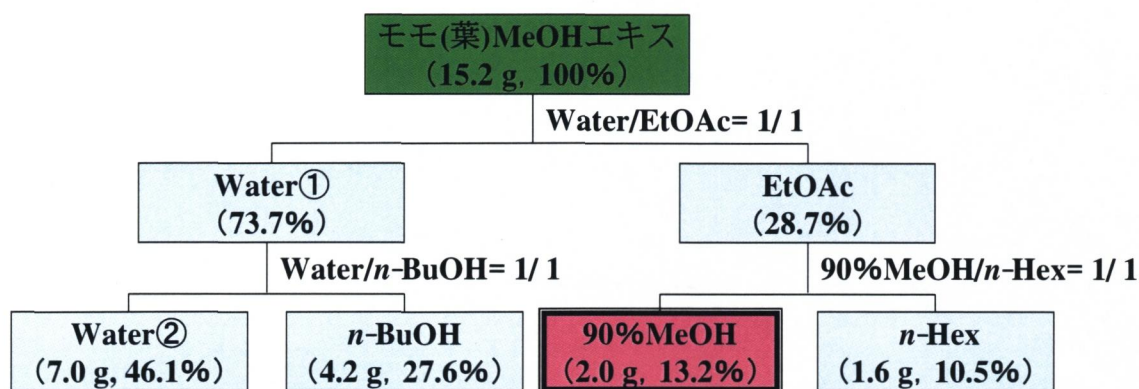


Fig.43 モモ葉エキスの活性成分の分離①

#### 5・15 モモ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用①

マウスを用いたモモ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用をFig.44に示した。モモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用の主な作用メカニズムは腸管におけるグルコース吸収阻害作用であることから、腸管におけるグルコースの吸収阻害作用を有する活性成分を優先して分離した。このため糖質にはグルコースを用いた。90% MeOH画分が糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。Water②画分と*n*-BuOH画分（1,000 mg/kg）はグルコース負荷試験における血糖値上昇抑制作用を示さなかった。また、データは示していないが、*n*-Hex画分も予備試験（*n*=6で2回）の糖負荷試験の結果から、グルコース負荷時における血糖値上昇抑制作用を示さなかった。このことから、腸管におけるグルコースの吸収阻害作用を有する活性成分は90% MeOH画分に含有されていることが示唆された。

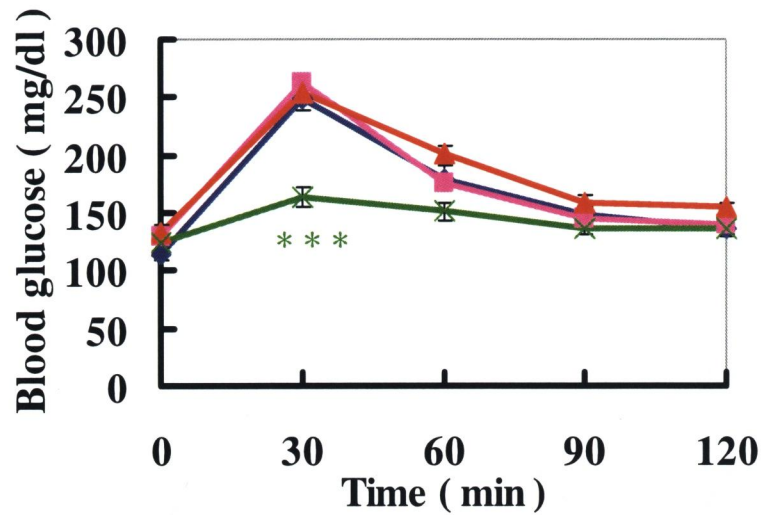


Fig.44 モモ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用①

◆ : グルコース 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )

■ : グルコース 1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキスWater②画分 (46.1%) 1,000 mg/kg

▲ : グルコース 1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキスn - BuOH画分 (27.6%) 1,000 mg/kg

× : グルコース 1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス90% MeOH画分 (13.2%) 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs control

\* 収率から投与量が1,000 mg/kg相当になるように投与量を換算した。

#### 5・16 モモ葉エキスの活性成分の分離②

Fig.44の結果から、活性成分は90% MeOH画分に含有されていることから、90% MeOH画分を分離した。90% MeOH画分2.0gを1Lの60% MeOH溶液に溶解させ、等量の60% MeOHとジクロロメタン( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )で分配した。全ての画分をエバポレーターで減圧濃縮後、凍結乾燥し、重量を測定した。これらの分配操作により、60% MeOH画分0.9 g,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 画分1.8gを得た (Fig.45)。

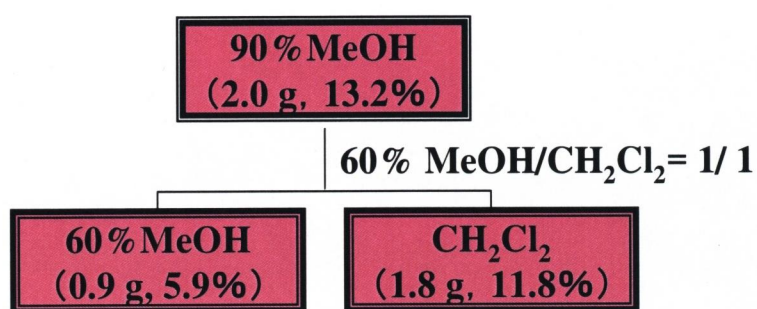


Fig.45 モモ葉エキスの活性成分の分離②

## 5・17 モモ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用②

マウスを用いたモモ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用をFig.46に示した。グルコース負荷試験において、60% MeOH画分とCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>画分の両方の画分が糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。このことから、両方の画分に、血糖値上昇を抑制する活性成分が含有されていることが示唆された。

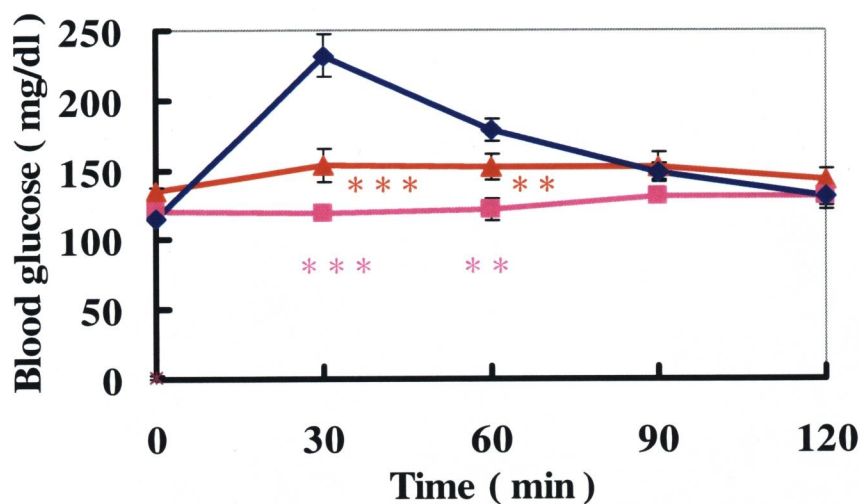


Fig.46 モモ葉エキス画分の血糖値上昇抑制作用②

◆ : デンプン 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )

■ : デンプン 1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキス60% MeOH画分(5.9%) 1,000 mg/kg

▲ : デンプン 1,000 mg/kg + モモ葉MeOHエキスCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>画分(11.8%) 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean ± S.E. \*\*\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$  vs control

\* 収率から投与量が1,000 mg/kg相当になるように投与量を換算した。



#### 5・18 モモ葉エキス画分の *in vitro* 試験における酵素阻害活性

モモ葉エキス画分を  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験, マルターゼ阻害活性試験, スクララーゼ阻害活性試験に供した。結果はFig.47に示した。60% MeOH画分にアミラーゼ阻害活性とスクラーゼ阻害活性が示された。また,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 画分にマルターゼ阻害活性が示された。

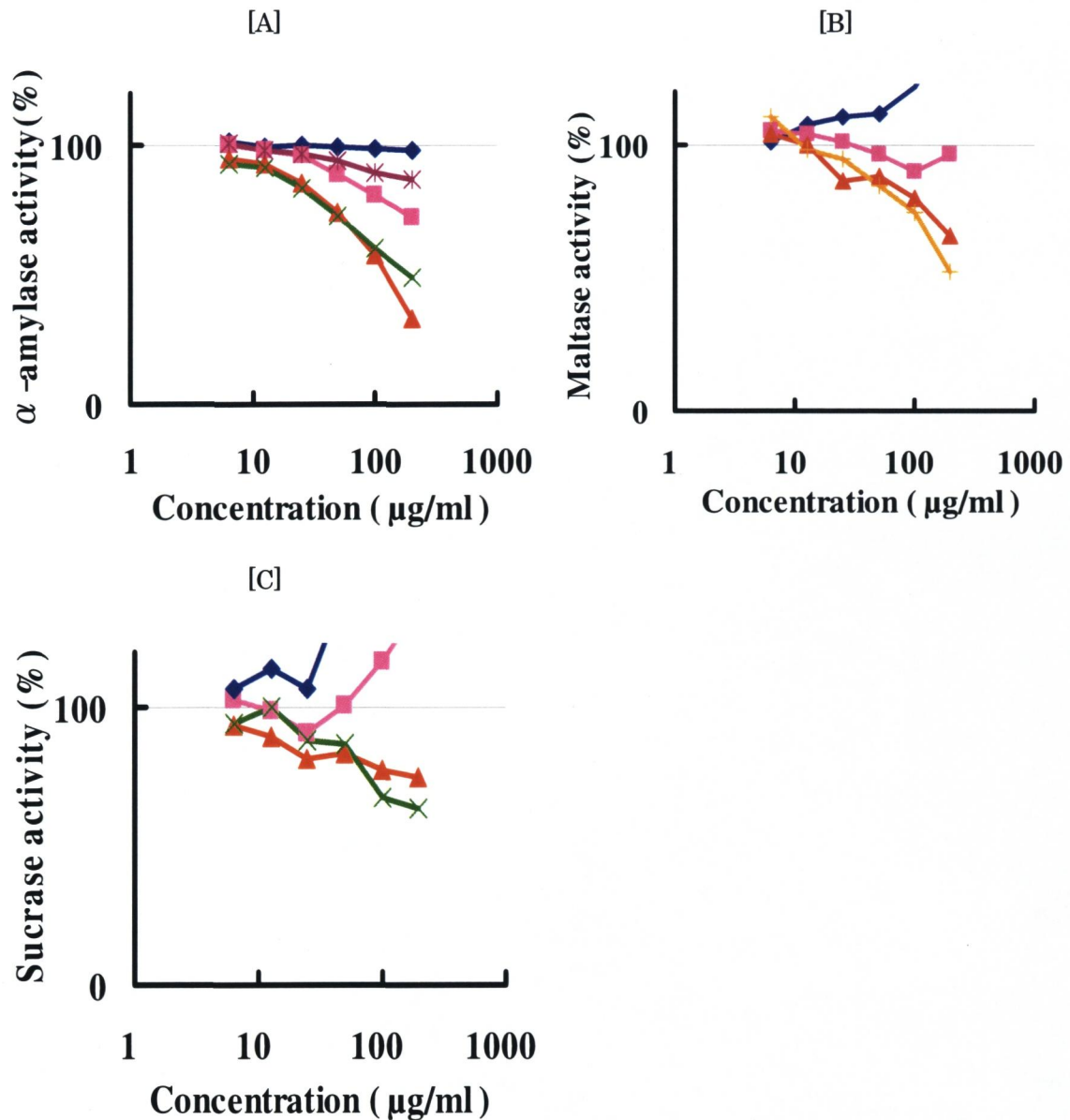


Fig.47 モモ葉エキス画分の *in vitro* 試験における酵素阻害活性

A:  $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験 B: マルターゼ阻害活性試験 C: スクララーゼ阻害活性試験

◆: Water②画分 ■: *n*-BuOH画分 ▲: 90% MeOH画分

×: 60% MeOH画分 +:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 画分

### 5・19 モモ葉エキスの活性成分の分離③

Fig.46とFig.47の結果から、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分を60% MeOH画分から、腸管におけるグルコース吸収阻害活性成分を $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 画分から分離することを試みた。分離方法には各種クロマトグラフィーを用いた。

#### 5・19・1 モモ葉エキスにある $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分の分離

それぞれの段階で基質にデンプンを用いた $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験を行い、活性成分を分離した。分離の手順はFig.48に示した。最終的にTLC上での挙動の違いから、Fr.M3-1からFr.M3-7の7つのFractionを得た。このFractionを用いた $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性試験の結果、Fr.M3-5が $\alpha$ -アミラーゼ活性を強力に阻害した。また、Fr.M3-5をMeOH可溶画分とMeOH不溶画分に分離したところ、MeOH可溶画分が $\alpha$ -アミラーゼ活性を強力に阻害した。このことからFr.M3-5のMeOH可溶画分にモモ葉エキス $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分が含有されていることが示唆された。

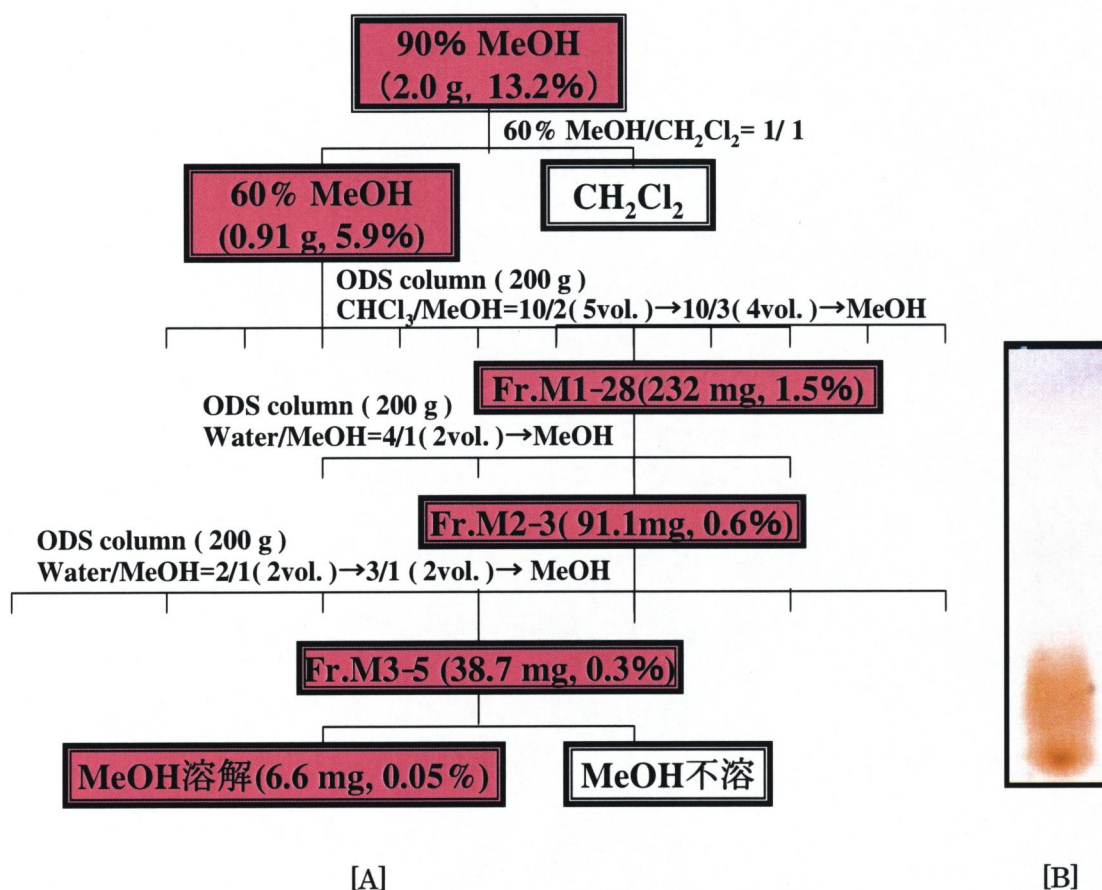


Fig.48 モモ葉エキスにある $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分の分離

A: 分離スキーム B: TLC (Silica プレート  $\text{CH}_3\text{Cl}_2$ : MeOH=10:3, アニスアルデヒド)

## 5・19・2 モモ葉エキスにある腸管におけるグルコースの吸収阻害活性成分の分離

それぞれの段階で糖質にグルコースを用いた糖負荷試験を行い，活性成分を分離した (Fig.49[A])。最終的にTLC上での挙動の違いから，7つのFractionを得た (Fig.49[B])。これら Fractionを用いたグルコース負荷試験の結果をFig.50に示した。Fr.C2 - 2糖負荷後30分時に有意に血糖値上昇を抑制した。このことからFr.C2 - 2にモモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用を有する活性成分が含まれていることが示唆された。

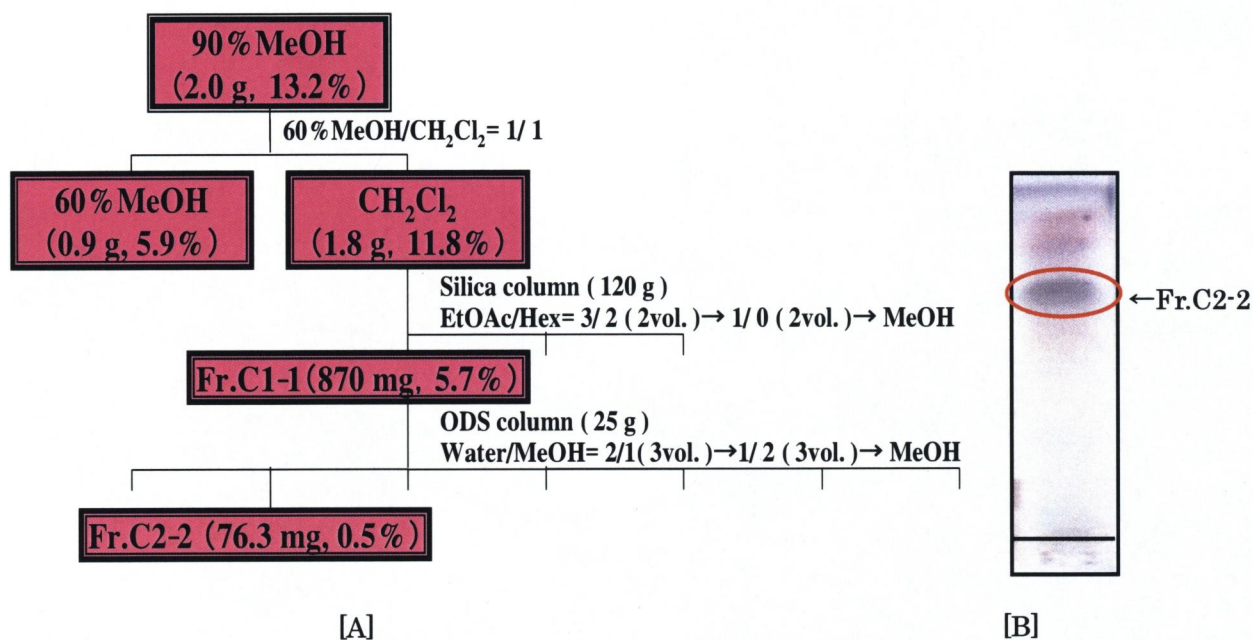


Fig.49 モモ葉エキスにある腸管におけるグルコースの吸収阻害活性成分の分離

A : 分離スキーム B : TLC (Silica プレート CH<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH=10 : 3, アニスアルデヒド)

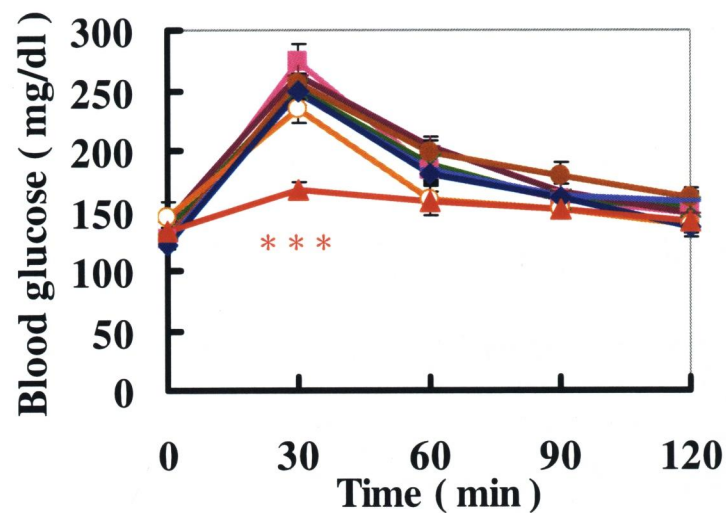


Fig.50 モモ葉エキスFr.C2画分の血糖値上昇抑制作用

- ◆ : グルコース 1,000 mg/kg + D.W. ( Control )
- : グルコース 1,000 mg/kg + モモ葉エキス画分 Fr.C2 - 1 1,000 mg/kg
- ▲ : グルコース 1,000 mg/kg + モモ葉エキス画分 Fr.C2 - 2 1,000 mg/kg
- × : グルコース 1,000 mg/kg + モモ葉エキス画分 Fr.C2 - 3 1,000 mg/kg
- +: グルコース 1,000 mg/kg + モモ葉エキス画分 Fr.C2 - 4 1,000 mg/kg
- : グルコース 1,000 mg/kg + モモ葉エキス画分 Fr.C2 - 5 1,000 mg/kg
- : グルコース 1,000 mg/kg + モモ葉エキス画分 Fr.C2 - 6 1,000 mg/kg
- : グルコース 1,000 mg/kg + モモ葉エキス画分 Fr.C2 - 7 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 6 W, n=6

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.005$  vs control

\* 収率から投与量が1,000mg/kg相当になるように投与量を換算した。

これらの結果から、 $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性を示す活性成分と腸管におけるグルコース吸収阻害作用を示す活性成分がそれぞれ異なることが示唆された。またFr.M3-5が $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分でFr.C2-2が腸管におけるグルコース吸収阻害活性成分であることが示唆された。

## 5・20 モモ葉エキスを含有される活性成分の構造解析

### 5・20・1 モモ葉エキスの $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分

マウスにおいて血糖値上昇抑制作用の見られたFr.M3-5はTLC上で単一スポットとして確認されたため、NMRによる分析を行った。測定したデータ ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY, HMQC, HMBC) は巻末の添付資料に載せた。

この化合物は黄色粉末状物として得られ、メタノールに可溶である。高分解能質量分析(ESIMS)より,  $[m/z\ 472.0945\ (\text{M}+\text{Na})^+]$  に分子イオンピークが確認されたことから, 分子式は  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$  であると決定された。

$^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて低磁場に2個の二重線水素 ( $\delta_{\text{H}}\ 6.9, 8.1$ ) と2個の単一線水素 ( $\delta_{\text{H}}\ 6.4, 6.2$ ) のシグナルが観測された。また  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルおよび HMQC スペクトルより, 1個のカルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}\ 179.9$ ) の存在と14個のオレフィン炭素の存在が示唆され, そのうちの6個 ( $\delta_{\text{C}}\ 167.3, 163.5, 162.1, 159.5, 159.1, 132.8$ ) についてはケミカルシフトから酸素原子に結合していることが推測された。そのほかに1個のアセタール炭素 ( $\delta_{\text{C}}\ 105.6$ ), 1個のオキシメチレン炭素 ( $\delta_{\text{C}}\ 63.1$ ), 4個のオキシメチン炭素 ( $\delta_{\text{C}}\ 78.9, 77.6, 75.5, 71.9$ ) の存在が示唆された。

これらの構造に関する情報に加え, COSY スペクトル, HMBC スペクトルの詳細な解析により, この化合物は上記アグリコンの3位にグルコースが結合した Kaempferol glycoside であると決定した (Fig.51)。

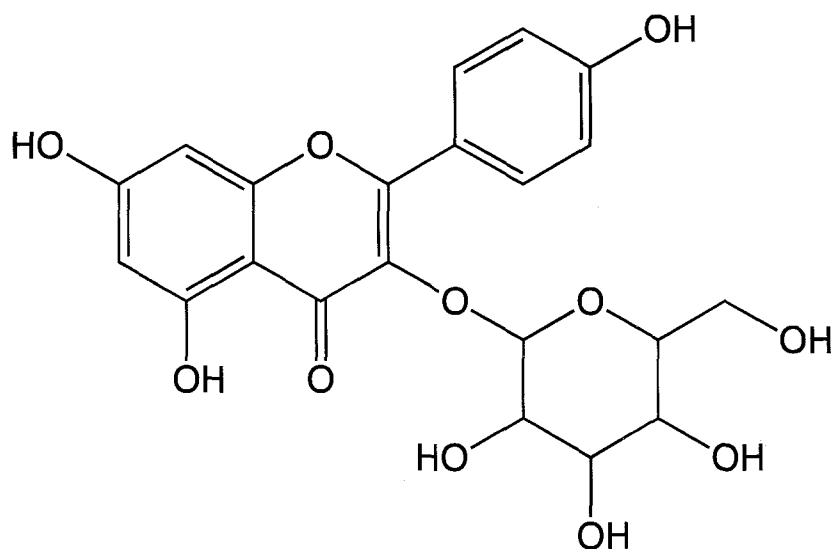


Fig.51 モモ葉エキスの $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分の平面構造



## 5・20・2 モモ葉エキスの腸管におけるグルコース吸収阻害活性成分

マウスにおいて血糖値上昇抑制作用の見られた Fr.M3-5 は TLC 上で単一スポットとして確認されたため、NMR による分析を行った。測定したデータ ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY, HMQC, HMBC) は巻末の添付資料に載せた。

この化合物は白色粉末状物として得られ、メタノールに可溶である。高分解能質量分析(ESIMS)より,  $[m/z\ 351.2031\ (\text{M}+\text{Na})^+]$  に分子イオンピークが確認されたことから, 分子式は  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_5$  であると決定された。

$^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて特徴的なシグナルとして,  $\delta_{\text{H}}\ 0.9\ \text{ppm}$  に三重線で現れるメチル基と考えられるシグナル, 3 から 5 ppm 付近に酸素と隣り合った炭素に結合する水素と考えられる 3 個の 1H 分のシグナル, 低磁場 ( $\delta_{\text{H}}\ 5.7$  から  $5.4\ \text{ppm}$  付近) にオレフィンプロトンと考えられる 4H 分のシグナルが観測された。また  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル, DEPT スペクトルおよび HMQC スペクトルより, 1 個のカルボニル炭素 ( $\delta_{\text{C}}\ 179.9$ ), 4 個のオレフィン炭素, 3 個のオキシメチン炭素 ( $\delta_{\text{C}}\ 78.9, 77.6, 75.5, 71.9$ ) の存在が示唆された。さらに COSY スペクトル, HMBC スペクトルにより Fig.52 に示す 3 つの部分構造が明らかとなった。

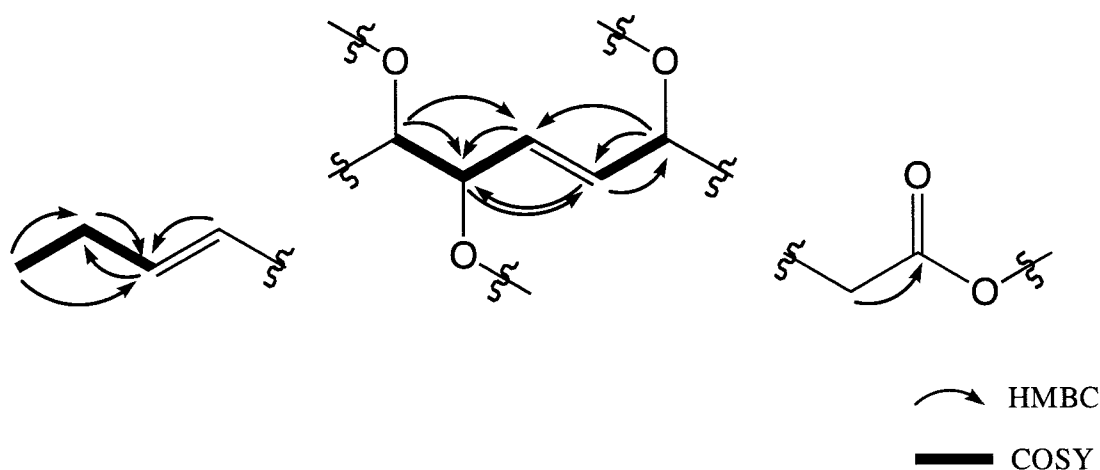


Fig.52 モモ葉エキスの腸管におけるグルコース吸収阻害活性成分の推定部分構造

HMBC スペクトルにおける相関と分子式から、上記部分構造に見られた酸素原子は水酸基およびカルボキシル基に対応するものと結論づけた。これらの構造に関する情報に加え、各種スペクトルの詳細な解析により、この化合物は3つの水酸基を有する直鎖脂肪酸であると考えた。水酸基の立体については現時点で決定に至っていないが、文献<sup>44)</sup>に示されているスペクトルデータとの比較から、この化合物は 9,12,13 - trihydroxyoctadeca - 10(*E*),15(*Z*) - dienoic acid であると推定した (Fig.53)。

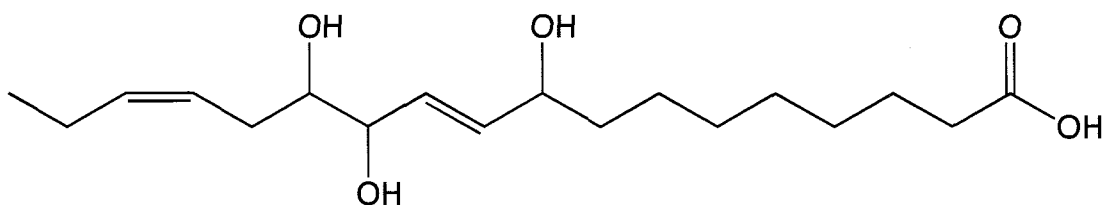


Fig.53 モモ葉エキスの腸管におけるグルコース吸収阻害活性成分の平面構造

## 5・21 糖尿病モデルマウスを用いた長期試験

モモ葉エキスはマウスにおいて食後の血糖値上昇抑制作用があることが明らかとなった。ここでは、糖尿病モデルマウス<sup>45)</sup>を用いて、モモ葉エキスの糖尿病の発症予防と改善に対する作用を検討した。

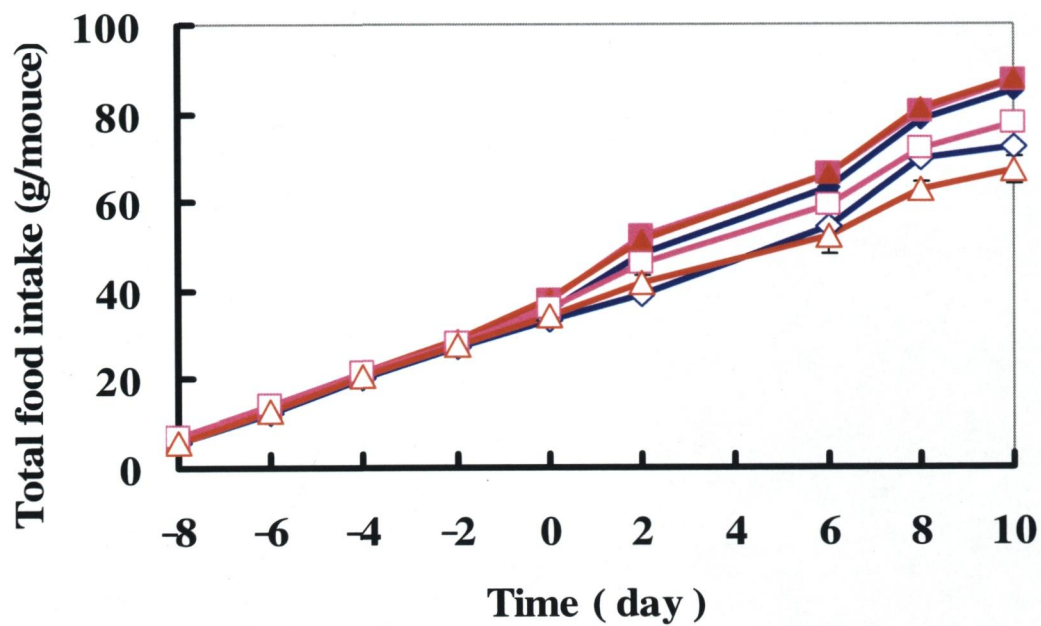
### 5・21・1 ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病モデルマウスを用いた糖尿病発症予防試験

あらかじめ 7 日間サンプル食を与えたマウスにおいてストレプトゾトシン (STZ) 誘発による糖尿病の発症予防作用の有無を検討した。総摂餌量と体重増加量と通常時血糖値の変化を Fig.55 に示した。Fig.54[A]より、総摂餌量に有意差はなかったが、糖尿病マウス群で正常マウス群と比べて STZ 投与から摂餌量が少ない傾向があった。Fig.54 [B] より、体重については、糖尿病コントロール群では STZ 投与 2 日目には正常コントロール群と比較して有意な体重減少を示した。糖尿病マウス群のモモ葉 MeOH エキス食群では 8 日目に STZ 投与による体重減少が有意に抑制された。Fig.54 [C] より、STZ 投与翌日には糖尿病マウス群は正常コントロール群と比較して有意に通常時血糖値が上昇した。糖尿病マウス群のモモ葉 MeOH エキス食群は、糖尿病コントロール群と比較して 1, 4, 8 日目に有意な血糖値低下作用を示した。

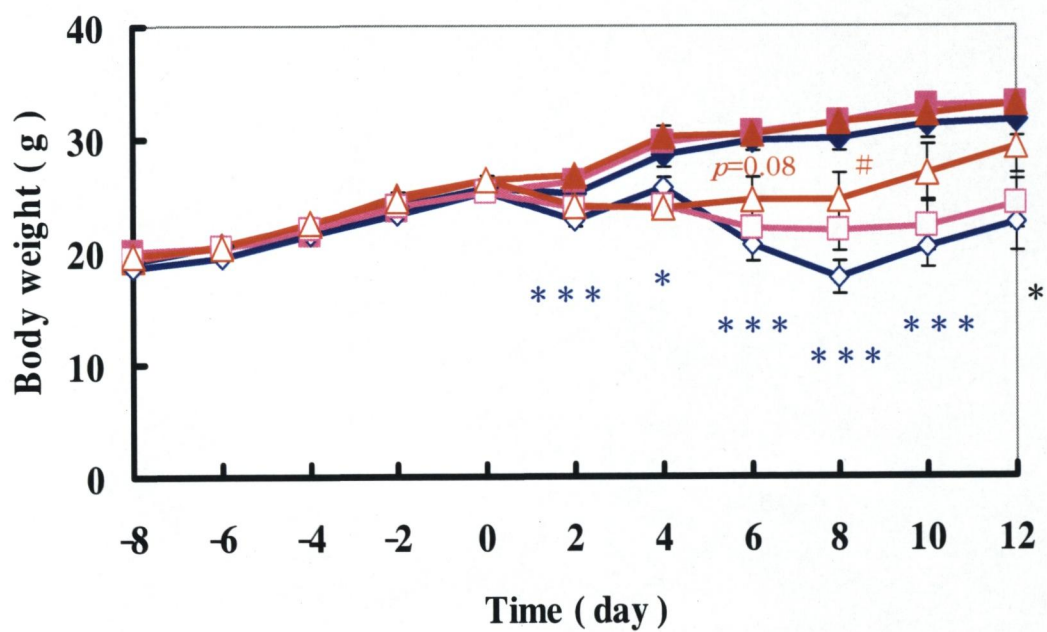
Fig.55 の結果より、それぞれの正常マウス群間には有意差がなかったことから、糖尿病マウス群のモモ葉 MeOH エキス食群には STZ 誘発による糖尿病の発症を遅延する作用があることが示唆された。作用メカニズムとして、STZ は膵臓β細胞を破壊し、インスリン分泌不全を招き、高血糖状態にさせることが知られているが、今回糖尿病マウス群のモモ葉 MeOH エキス食群では、糖尿病コントロール群と比較して血糖値上昇を穏やかにしたことから、モモ葉エキに含まれる抗酸化成分が、STZ 投与後の初期の段階でβ細胞の破壊を抑制したことが示唆された。

試験終了後の臓器重量測定の結果を Fig.55 に示した。正常マウス群間に有意差がなかったことから、20 日間のモモ葉エキスの摂食はマウスの臓器重量に影響を与えなかったことが示唆された。また、Fig.55[B]に示すように、糖尿病コントロール群は正常コントロール群と比較して有意に体重当たりの腎臓重量が増加したが、これは STZ 投与により体重が減少したことによると示唆された。

また、この試験期間中に糖尿病マウス群で STZ 投与翌日からマウスが死亡し、最終的に 6 割ほどマウスが死亡した。解剖の結果、STZ 投与による膵臓β細胞以外の臓器細胞へのダメージによること等が示唆されたが、詳細な原因は不明であった。

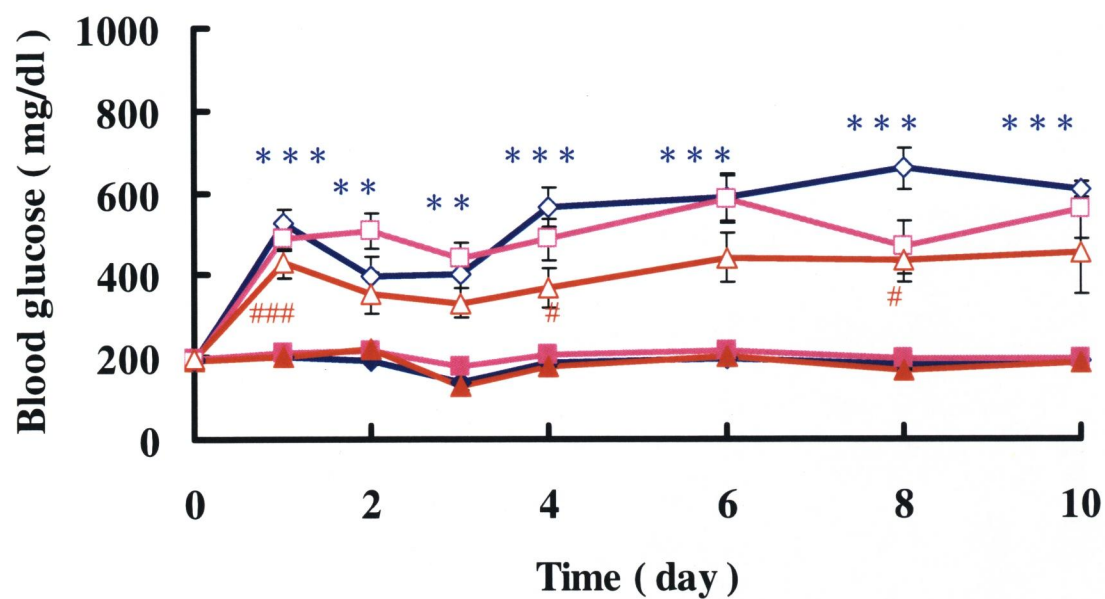


[A] 総摂餌量の変化



[B] 体重増加量の変化

(Fig.57 解説は次項)



[C] 通常時血糖値の変化

Fig.54 総摂餌量 [A] と体重増加量 [B] と通常時血糖値 [C] に及ぼすモモ葉エキスの影響

- |            |                |               |
|------------|----------------|---------------|
| ◆ : 正常マウス  | + コントロール食      | (正常Control群)  |
| ■ : 正常マウス  | + モモ葉Waterエキス食 |               |
| ▲ : 正常マウス  | + モモ葉MeOHエキス食  |               |
| ◇ : 糖尿病マウス | + コントロール食      | (糖尿病Control群) |
| □ : 糖尿病マウス | + モモ葉Waterエキス食 |               |
| △ : 糖尿病マウス | + モモ葉MeOHエキス食  |               |

Std : ddY mice, male, 4 W, n=10 (正常マウス群), n=20 (糖尿病マウス群)

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \*\*\* $p$  < 0.005, \*\* $p$  < 0.01 vs control

### $p$  < 0.005, # $p$  < 0.05 vs diabetic control



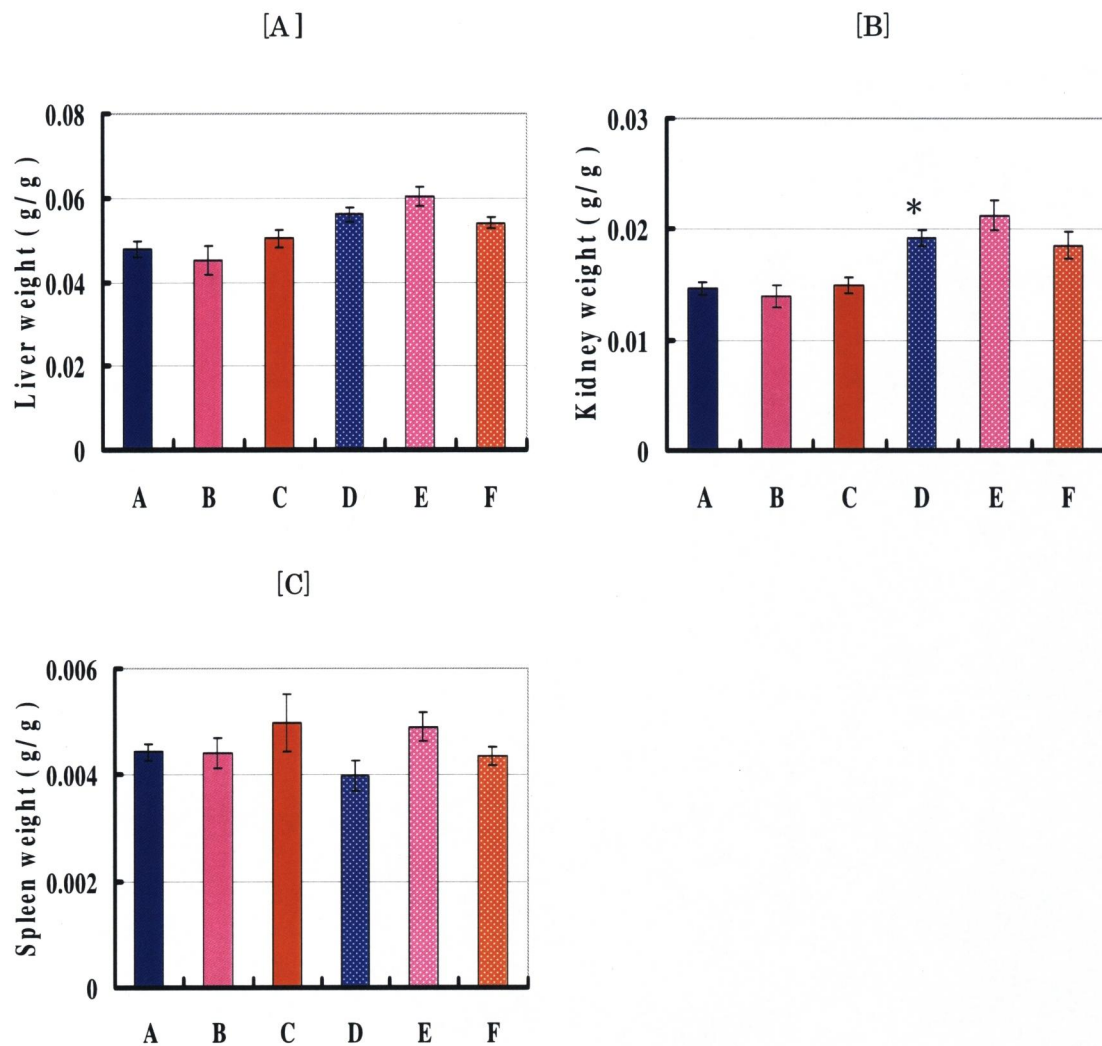


Fig.55 臓器重量に及ぼすモモ葉エキスの影響

[A] 肝臓重量

[B] 腎臓重量

[C] 脾臓重量

■ : 正常マウス

+ コントロール食

(正常Control群)

■ : 正常マウス

+ モモ葉Waterエキス食

■ : 正常マウス

+ モモ葉MeOHエキス食

□ : 糖尿病マウス

+ コントロール食

(糖尿病Control群)

□ : 糖尿病マウス

+ モモ葉Waterエキス食

□ : 糖尿病マウス

+ モモ葉MeOHエキス食

Std : ddY mice, male, 4 W, n=10 (正常マウス群), n=20 (糖尿病マウス群)

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \* $p < 0.05$  vs control

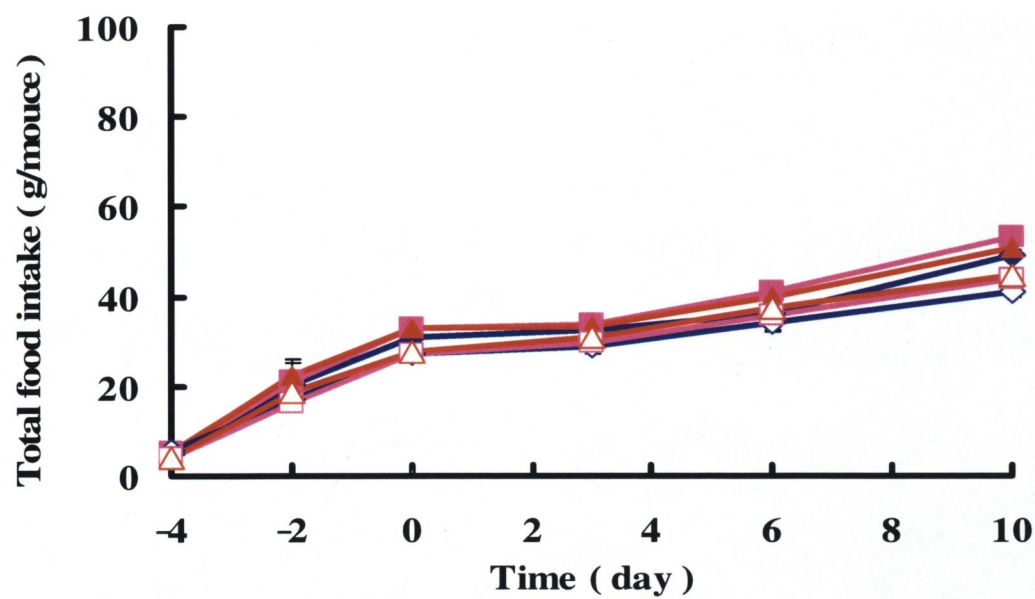
#### 5・21・2 ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病モデルマウスを用いた糖尿病改善試験

ストレプトゾトシン(STZ)誘発により糖尿病モデルマウスを作成し、その後モモ葉エキス食を与え、モモ葉エキスの糖尿病改善作用の有無を検討した。総摂餌量と体重増加量と通常時血糖値の変化を Fig.56 に示した。Fig.56[A]より、総摂餌量に有意差はなかった。Fig.56 [B] より、体重については、STZ 投与により糖尿病マウス群で正常マウス群と比較して有意な体重減少を示した。その後の体重変化にそれぞれの群でサンプルによる差はなかった。Fig.56 [C] より、正常コントロール群と比較して糖尿病コントロール群で有意に通常時血糖値が高い糖尿病マウス群において、糖尿病マウス群のモモ葉 MeOH エキス食群は、糖尿病コントロール群と比較して 4, 6, 8 日目に有意な血糖値低下作用を示した。

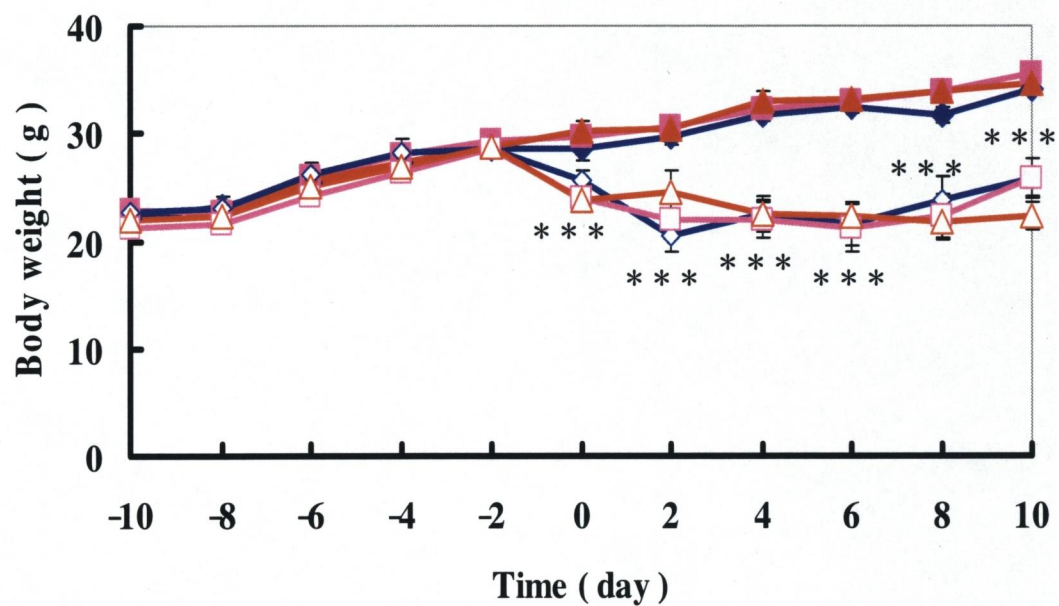
Fig.56 の結果から、正常マウス群の間には有意差がなかったことから、糖尿病マウス群のモモ葉 MeOH エキス食群は糖尿病マウス群における高血糖状態の進展を一時的に遅延する作用があることが示唆された。今回用いた糖尿病モデルマウスは STZ の作用により膵臓β細胞が破壊され、インスリン分泌がほぼ不可能な状態にあるため、作用メカニズムとしてはインスリン分泌促進作用ではなく、インスリン様作用が推定される。Fig.56 [C] の 4~8 日目でモモ葉 MeOH エキス食群が糖尿病コントロール群に対して有意に通常時血糖値を抑制していることから、モモ葉エキスをインスリン様作用があることが示唆された。しかしながら、その作用は、糖尿病の高血糖状態を改善するまでには至らなかった。しかし、投与量や実験系を工夫することにより、モモ葉エキスの有用性が確認され则认为している。

試験終了後の臓器重量測定の結果を Fig.57 に示した。正常マウス群間に有意差がなかったことから、10 日間のモモ葉エキスの摂食はマウスの臓器重量に影響を与えなかったことが示唆された。

また、この試験期間中に糖尿病マウス群で STZ 投与翌日からマウスが死亡し、最終的に 6 割ほどマウスが死亡した。解剖の結果、STZ 投与による膵臓β細胞以外の臓器細胞へのダメージによること等が示唆されたが、詳細な原因は不明であった。

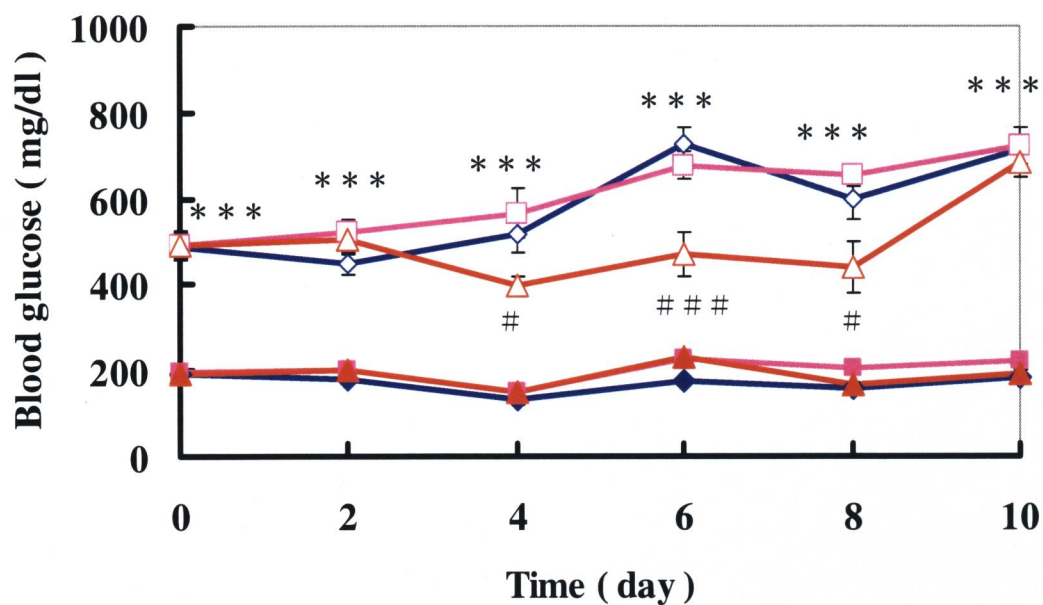


[A] 総摂餌量の変化



[B] 体重増加量の変化

(Fig.56 解説は次項)



[C] 通常時血糖値の変化

Fig.56 総摂餌量 [A] と体重増加量 [B] と通常時血糖値 [C] に及ぼすモモ葉エキスの影響

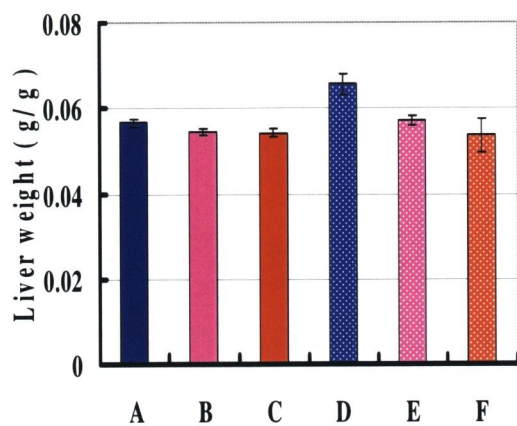
- ◆ : 正常マウス + コントロール食 (正常Control群)
- : 正常マウス + モモ葉Waterエキス食
- ▲ : 正常マウス + モモ葉MeOHエキス食
- ◇ : 糖尿病マウス + コントロール食 (糖尿病Control群)
- : 糖尿病マウス + モモ葉Waterエキス食
- △ : 糖尿病マウス + モモ葉MeOHエキス食

Std : ddY mice, male, 4 W, n=10 (正常マウス群), n=20 (糖尿病マウス群)

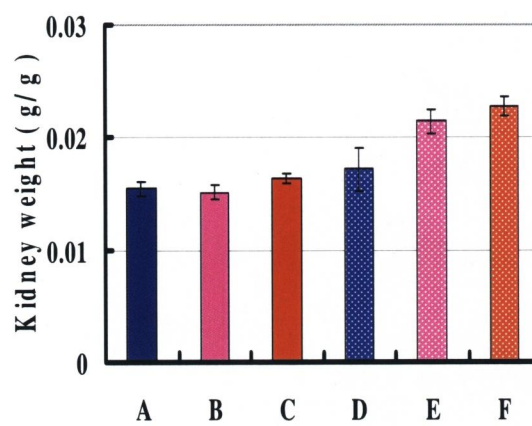
Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.

\*\*\* $p < 0.005$  vs control

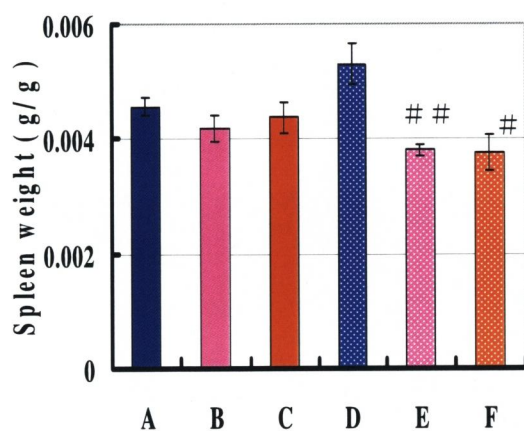
### $p < 0.005$ , # $p < 0.05$  vs diabetic control



[A]



[B]



[C]

Fig.57 臓器重量への影響

[A] 肝臓重量

[B] 腎臓重量

[C] 脾臓重量

■ : 正常マウス

+ コントロール食

(正常Control群)

■ : 正常マウス

+ モモ葉Waterエキス食

■ : 正常マウス

+ モモ葉MeOHエキス食

□ : 糖尿病マウス

+ コントロール食

(糖尿病Control群)

□ : 糖尿病マウス

+ モモ葉Waterエキス食

□ : 糖尿病マウス

+ モモ葉MeOHエキス食

Std : ddY mice, male, 4 W, n=10 (正常マウス群), n=20 (糖尿病マウス群)

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \* $p < 0.05$  vs control ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  vs diabetic control



## 5・22 モモ葉エキスのコレステロール上昇抑制試験

モモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用があることが明らかとなったので、モモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用以外の生理作用があるかどうかを検討した。ここでは、血中コレステロール上昇抑制作用と血中トリグリセリド (TG) 上昇抑制作用をマウスを用いた脂質負荷試験で検討し、本項と次項に結果を示した。ポジティブコントロールとして黒烏龍茶エキスをを用いた。Fig.58にマウスを用いたモモ葉エキスのコレステロール上昇抑制作用を示した。その結果、黒烏龍茶エキスは脂質投与後4時間目にコントロールと比較して有意にコレステロール上昇を抑制したが、モモ葉エキスはコレステロール上昇抑制作用を示さなかった。

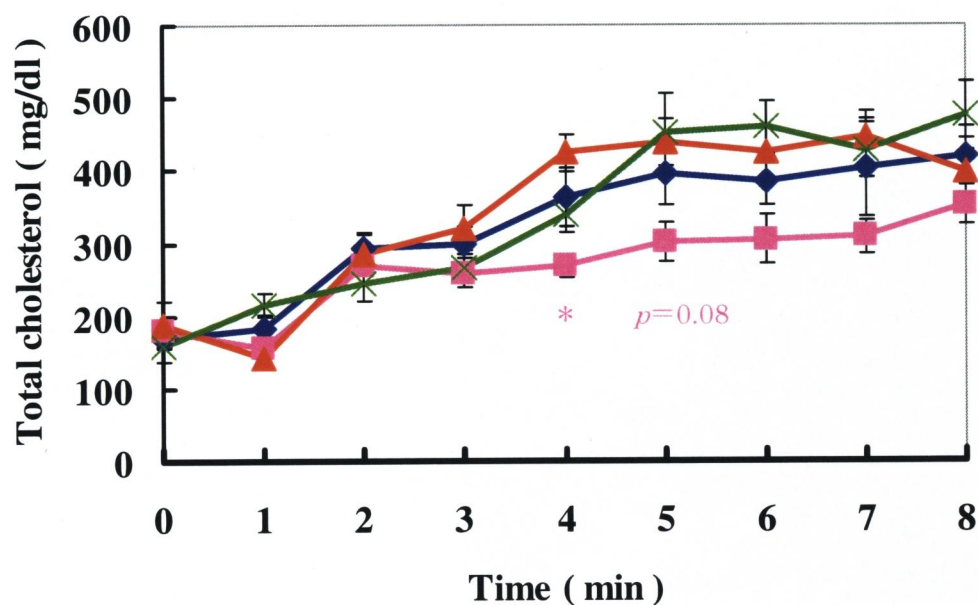


Fig.58 モモ葉エキスのコレステロール上昇抑制試験

- ◆ : コレステロール懸濁液 + D.W. ( Control )
- : コレステロール懸濁液 + 黒烏龍茶エキス 1,000 mg/kg
- ▲ : コレステロール懸濁液 + モモ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg
- × : コレステロール懸濁液 + リンゴ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 7 W, n=8

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. \* $p < 0.05$  vs control

### 5・23 モモ葉エキスのトリグリセリド上昇抑制試験

また、Fig.59にマウスを用いたモモ葉エキスの血中トリグリセリド（TG）上昇抑制作用を示した。結果より、黒烏龍茶エキスは脂質投与後1～7時間目にコントロールと比較して有意にトリグリセリド上昇を抑制した。モモ葉エキスはトリグリセリド上昇抑制作用を示さなかった。このことから、少なくとも、モモ葉エキスに含まれる血糖値上昇抑制作用を有する成分は、糖質分解酵素の阻害活性を有するが、コレステロールやトリグリセリドのような脂質の吸収阻害に関連する作用は示さないことが示唆された。

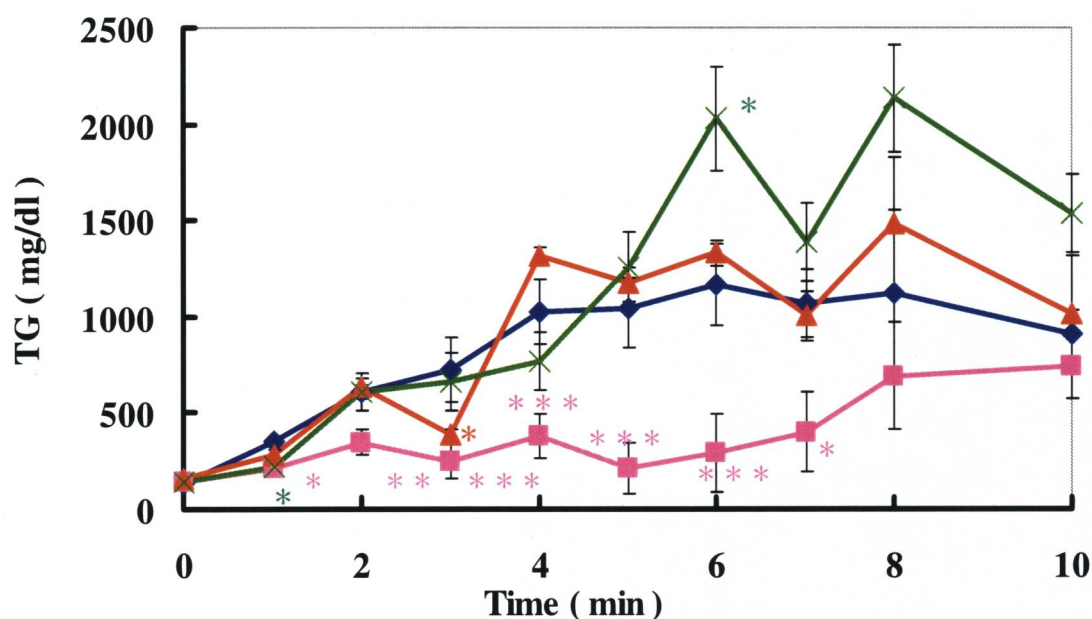


Fig.59 モモ葉エキスのトリグリセリド上昇抑制試験

- ◆ : コレステロール懸濁液 + D.W. ( Control )
- : コレステロール懸濁液 + 黒烏龍茶エキス 1,000 mg/kg
- ▲ : コレステロール懸濁液 + モモ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg
- × : コレステロール懸濁液 + リンゴ葉MeOHエキス 1,000 mg/kg

Std : ddY mice, male, 7 W, n=8

Data are expressed as mean ± S.E. \*\*\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs control

## 5・24 まとめ

モモの葉はこれまで果実収穫後に食品としてとくに利用されていなかった廃棄物であったが、今回の研究によりマウスでの血糖値上昇抑制作用、糖類分解酵素の阻害作用、腸管におけるグルコースの吸収阻害作用が示され、その有効利用が提示されたと考えられる。モモの葉の活性成分として、本研究では、 $\alpha$ -アミラーゼ活性を阻害する成分と腸管におけるグルコースの吸収阻害成分が別々にあり、それぞれの成分を分離し、同定した。粗抽出物に見い出されたスクラーゼ活性を阻害する成分とマルターゼ活性を阻害する成分については今回は研究を進めなかったため、今後これら酵素を阻害する成分が新たに見い出されるかもしれない。また、モモの葉の血糖値上昇抑制作用のメカニズムは腸管におけるグルコースの吸収阻害成分が主であると考えており、それに糖質分解酵素を阻害する活性成分が複数含有されていると考えられるので、血糖値上昇抑制作用のメカニズムの相加効果があると期待できる。様々な検討試験の結果、活性成分は葉に多く含有しており、可食部である実には有意な血糖値上昇抑制作用を示さなかった。このことは未利用資源である葉の有効利用になると考えられる。抽出溶媒も水やエタノールが使用できること、活性が高温でも充分保たれていることから食品原料として使用できることも明らかとなった。モモの葉にはモモの果実と同様に甘い香りがすることから、香気成分を保持したまま食品の原料に使用できるようにすれば付加価値も高まることが示唆された。血糖値上昇抑制作用は本研究の間に見出したサンプル中最も強力なもので、同じバラ科の果樹植物の中でも最も強力であることから、モモ葉エキスは血糖値上昇抑制作用を有する新規機能性食品としても広く応用できることが示唆された。

## 第6章 総括

本論文では、*in vitro*試験と*in vivo*試験のスクリーニングを行って、いくつかの果実の葉エキスを成分に血糖値上昇抑制作用を確認し、その中でもキウイ葉エキスとモモ葉エキスは顕著な血糖値上昇抑制作用を示すことを明らかにした。キウイ葉エキスの活性は糖質分解酵素である $\alpha$ -アミラーゼ活性を阻害する成分とスクラーゼを阻害する成分の二つの活性成分によるものであった。また、モモ葉エキスの活性は主に腸管におけるグルコース吸収を阻害する成分といくつかの糖質分解酵素の活性を阻害する成分によるものであった。このうち活性成分の構造が決定したものととして、モモの $\alpha$ -アミラーゼ活性を阻害する成分として、ポリフェノールの一種であるケンフェロール配糖体と、モモの腸管におけるグルコース吸収を阻害する成分として9,12,13-trihydroxyoctadeca-10(E),15(Z)-dienoic acidの2つがある。また、キウイの $\alpha$ -アミラーゼ活性を阻害する成分はトリテルペン的一种であることが推定された。ケンフェロール配糖体はモモの花にも多く含まれていることが報告されている<sup>46)</sup>。生理作用として抗酸化作用が報告されている。また、今回同定した腸管におけるグルコース吸収阻害活性成分の関連化合物は中国の漢方処方法の一つである小青竜湯という8つの植物からなる生薬に見い出されている<sup>47)</sup>。また、オカヒジキにも見い出されている<sup>44)</sup>。どちらも血糖値上昇抑制作用としての報告がないことから、今後もこうした研究を通じて様々な機能性成分と作用が明らかになると考えられる。現在、キウイ葉エキスとモモ葉エキスの血糖値上昇抑制作用のメカニズムの詳細な解明に向けて活性成分の構造を決定するためのさらなる研究を行っている。両葉エキスは未利用資源である葉の有効利用になり、熱水抽出エキスにおいても血糖値上昇抑制作用を有すること、高温での乾燥でも活性を失わないことから、様々な食品に応用できることが示唆された。今後、安全性やヒト臨床試験などにより、糖尿病の予防やメタボリックシンドロームの予防に用いられる新規食品食材としての開発へと繋げていきたい。2006年の健康保険法の改正により、2008年4月より、全国の市町村の40～74歳の保険加入者を対象とした特定健康診査が導入される。この制度の目的は、メタボリックシンドロームに着目し、この該当者及び予備群を減少させるための特定保健指導を必要とする者を的確に抽出し、糖尿病や高脂血症、高尿酸血症などの生活習慣病の発症や重症化を予防することであり、このような制度を作り、メタボリックシンドローム対策の柱としている。このような背景からも本研究が重要であると考えている。

糖尿病の予防やメタボリックシンドロームの予防に有効な食品素材の探索研究を通じて、親しみやすく安心して長い期間摂取できる新しい素材を見つけ出し、さまざまな志向性に対応できる魅力的な機能性食品を提供することで、健康な人々にも「食品による疾病予防」に

関心を向けさせる努力をしていきたい。病気になっていない健康な人々に認知され、受入れられることで、初めて疾病の予防・改善に結びつくに違いないと確信している。健康な人々が日常の食生活の中で、自分の意志で自分の体を病気から予防する手段を選択できる環境を作っていくことで社会に貢献していきたいと思う。



## 謝辞

本研究の遂行にあたり、懇切な御指導と御助言を賜り、且つまた、本論文を校閲して頂きました東京海洋大学大学院ヘルスフード科学(中島董一郎記念)寄附講座教授 矢澤一良博士ならびに准教授 小山智之博士に謹んで感謝の意を表します。

また、本論文を校閲して頂きました東京海洋大学大学院生体物質化学研究室教授 長島裕二博士に深く感謝の意を表します。

さらに、本研究を始めるにあたり、実験方法を御指導して頂きました本研究のチームリーダーである本間篤史氏に深く感謝いたします。

また、湘南予防医科学研究所 大塚伊津子主任研究員ならびに興石君子さん、三瓶英子さん、ヘルスフード科学講座の寄附者である株式会社中島董商店及びキューピー株式会社に厚く御礼申し上げます。

終わりに、日々の研究生生活を支えてくれた研究室の皆様、そして家族に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 厚生労働省, <http://www.mhlw.go.jp/index.html>.
- 2) Shankar, SS., Steinberg, HO., FFAs. do they play a role in vascular disease in insulin resistance syndrome? *Curr. Diab. Rep.*, **5**, 30-35 (2005).
- 3) 矢澤一良, ヘルスフード科学概論, 成山堂書店 (東京), pp. 128 (2003).
- 4) 矢澤一良, ヘルスフード科学講座, 食品化学新聞社 (東京), pp. 197 (2007).
- 5) Bischoff, H., The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes. *Clin. Invest. Med.*, **18**, 303-311 (1995).
- 6) Terauchi, Y., Iwamoto, K., Tamemoto, H., Komeda, K., Ishii, C., Kanagawa, Y., Asanuma, N., Aizawa, T., Akanuma, Y., Yasuda, K., Kodama, T., Tobe, K., Yazaki, Y., Kadowaki, T., Development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the double knockout mice with disruption of insulin receptor substrate-1 and beta cell glucokinase genes. Genetic reconstitution of diabetes as a polygenic disease. *J. Clin. Invest.*, **99**, 861-866 (1997).
- 7) Weisberg, SP., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, RL., Ferrante, AW. Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, **112**, 1796-1808 (2003).
- 8) Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, **112**, 1821-1830 (2003).
- 9) Rasmussen, SK., Urhammer, SA., Berglund, L., Jensen, JN., Hansen, L., Echwald, SM., Johnsen, KB., Horikawa, Y., Mashima, H., Lithell, H., Cox, NJ., Hansen, T., Bell, GI., Pedersen, O., Variants within the calpain-10 gene on chromosome 2q37 (*NIDDM1*) and relationships to type 2 diabetes, insulin resistance, and impaired acute insulin secretion among scandinavian caucasians. *Diabetes*, **51**, 3561-3567 (2002).
- 10) 厚生労働省, <http://www.mhlw.go.jp/index.html>.
- 11) Inagawa, A., Hanafusa, T., Tamura, S., Moriwaki, M., Itoh, N., Yamamoto, K., Iwahashi, H., Yamagata, K., Waguri, M., Nanmo, T., Uno, S., Nakajima, H., Namba, M., Kawata, S., Miyagawa, JI., Matsuzawa, Y., Pancreatic biopsy as a procedure for detecting insitautoimmune phenomena in type 1 diabetes mellitus-Close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity-. *Diabetes*, **50**, 1269-1273 (2001).
- 12) 堀田饒, 糖尿病予防と治療のストラテジー, 名古屋大学出版会, 5-7 (2003).
- 13) 松下美加, 宮崎滋, 糖尿病の病態と糖尿病を予防する食生活, *Food Style* 21, 1, 45-48 (2004).
- 14) Brownlee, M., Cerami, A., Vlassara, H., Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab. Rev.*, **4**, 437-451 (1988).
- 15) Cogan, DG., Kinoshita, JH., Kador, PF., Robinson, G., Datilis, MB., Cobo, LM., Kupfer, C., NIH conference. Aldose reductase and complications of diabetes. *Ann. Intern Med.*, **101**,

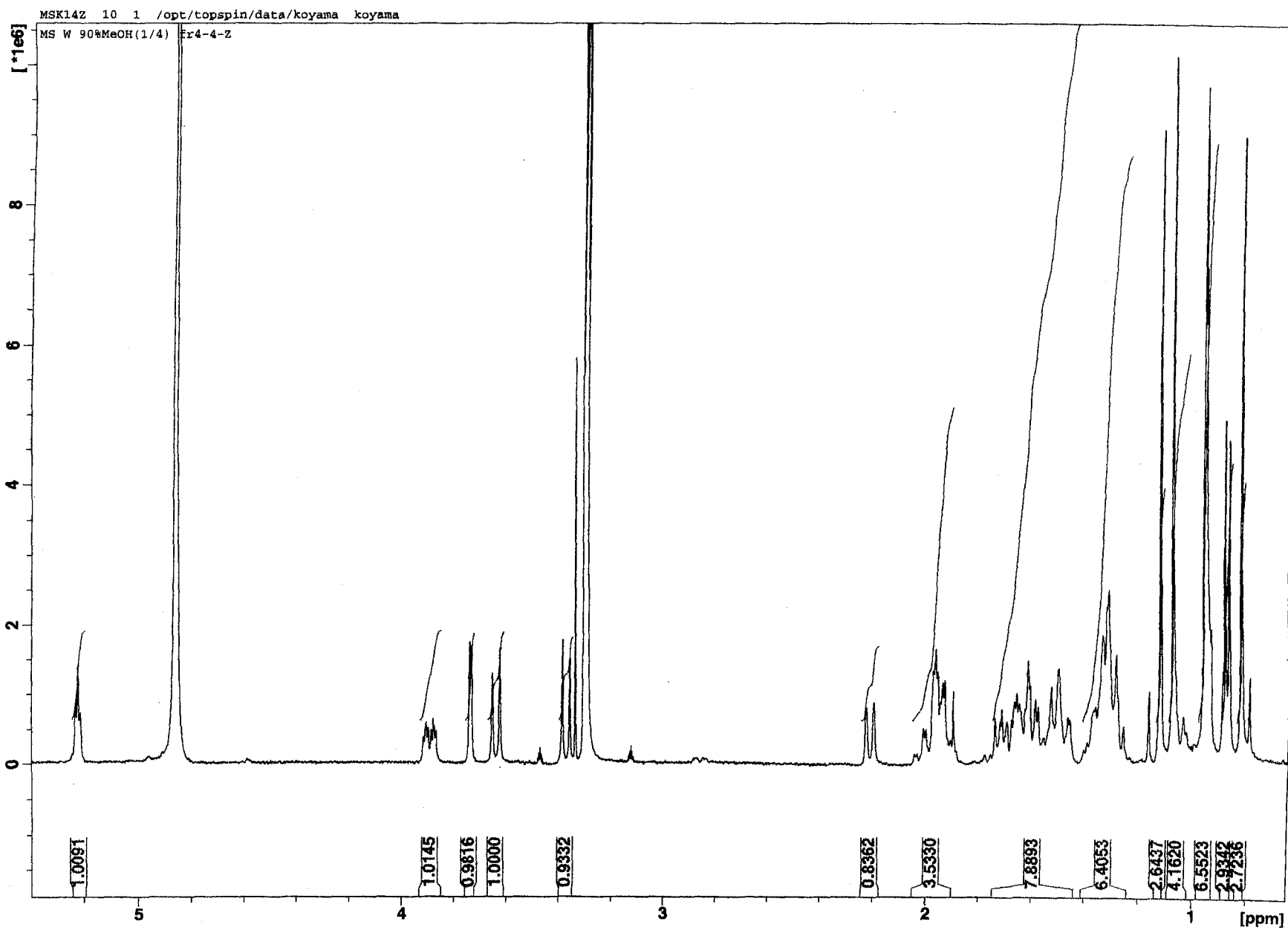
- 82-91 (1984).
- 16) Koya, D., et al, Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC-beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *FASEB J.*, **14** (2000).
  - 17) Carven, PA., Melhem, MF., Phillips, SL., DeRubertis, FR., Overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects against early diabetic glomerular injury in transgenic mice. *Diabetes*, **50**, 2114-2125 (2001).
  - 18) Howey, DC, Bowsher, RR., Brunelle, RL., Woodworth, JR., [Lis (B28), Pro (B29)]-human insulin. A rapidly absorbed analog of human insulin. *Diabetes*, **43**, 396-402 (1994).
  - 19) Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, JP 4th, Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., Bryan, J., Reconstitution of IKTP : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, **270**, 1166-1170 (1995).
  - 20) Gribble, FM., Ashcroft, FM., Differential sensitivity of beta-cell and extrapancreatic K-ATP channels to gliclazide. *Diabetologia*, **42**, 845-848(1999).
  - 21) 荒木栄一, 河島淳二, 水流添寛., インスリン抵抗性改善薬の作用とその機序-チアゾリジン誘導体とピクアナイト薬-, 最新医学, **57**, 1834-1841(2002).
  - 22) Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., MUsi, N., Hirshman, MF., Goodyear, LJ., Moller, DE., Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J.Clin.Invest.*, **108**, 1167-1174 (2001).
  - 23) Irene, MS., Amanda, IA, et al., Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPD 35): prospective observational study., *J. British Med.*, **321**, 405-412 (2000).
  - 24) Aizawa, T., Komatsu, M., Rab27a: a new face in b-cell metabolism-secretion coupling., *J. Clin. Invest.*, **115**, 227-230 (2005).
  - 24) Krause, HP., Keup, U., Puls, W., Inhibition of disaccharide digestion in rat intestine by the alpha-glucosidase inhibitor acarbose (BAY g 5421). *Digestion.*, **23**, 232-238 (1982).
  - 25) Sakamoto, N., Tajima, N., Effects of acarbose, alpha-glucosidase inhibitor in treatment of impaired glucose tolerance. *Nippon Rinsho* (in Japanese), **63**, 451-456 (2005).
  - 26) Nakamura, J., Effects of voglibose, alpha-glucosidase inhibitor in treatment of impaired glucose tolerance. *Nippon Rinsho* (in Japanese), **63**, 457-461 (2005).
  - 27) Tormo, MA., Ropero, MF., Nieto, M., Martinez, IM., Campillo, JE., In vitro study of the effect of miglitol on carbohydrate digestion and intestinal metabolism in normal and non-insulin-dependent diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **74**, 1196-1203 (1996).
  - 28) Chiasson, J.L., Josse, R.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., Acarbose for prevention of type2 diabetes mellitus:STOP-NIDDM randomised trial.Lancet., **359**, 2072-2076(2002).
  - 29) 松井利郎, 食品成分による糖尿病予防, *New Food Industry.*, **45**, 1-8 (2003).

- 30) Morimoto, S., Myazaki, T., Wheat albumin with amylase-inhibitory activity suppresses glycemic rise after rice loading in human subjects. *Japan. S. Nutr. Food Sci.*, (in Japanese), **52**, 285-291 (1999).
- 31) Deguchi, Y., Osada, K., Uchida, K., Kimura, H., Yoshikawa, M., Tatsuyuki, K., Yasui H., and Watanuki, M., Effects of extract of guava leaves on development of diabetes in the db/db mouse and on the postprandial blood glucose of human subjects. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* (in Japanese), **72**, 923-931 (1998).
- 32) Fujita, H., Yamagami, T., Ohshima, K., Long-term ingestion of a fermented soybean-derived Touchi-extract with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity is safe and effective in human with borderline and mild type-2 diabetes. *J. Nutr. Sci.*, **131**, 2105-2108 (2001).
- 33) Wakabayashi, S., The Effects of indigestible dextrin on sugar tolerance: I. Studies on digestion-absorption and sugar tolerance. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* (in Japanese), **68**, 623-635 (1992).
- 34) Seri, K., Sanai, K., Matsuo, N., Kawakubo, K., Xue, C., Inoue, S., L-arabinose selectively inhibits intestinal sucrase in an uncompetitive manner and suppresses glycemic response after sucrose ingestion in animals. *Metabolism.*, **45**, 1368-1374 (1996).
- 35) Miyahara, C., Miyazawa, M., and Satoh, S., Inhibitory effects of mulberry leaf extract on postprandial hyperglycemia in normal rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **50**, 161-164 (2004).
- 36) Shimizu, K., Iino, A., Nakajima, J., Tanaka, K., Nakajyo, S., Urakawa, N., Atsuchi, M., Wada, T., Yamashita, C., Suppression of glucose absorption by some fractions extracted from *Gymnema sylvestre* leaves. *J. Vet. Med. Sci.*, **59**, 245-251 (1997).
- 37) Heacock, PM., Hertzler, SR., and Williams, JA., Effect of medical food containing an herbal  $\alpha$ -glucosidase inhibitor on postprandial glycemia and insulinemia in healthy adults. *J. Am. Diet. Assoc.*, **105**, 65-71 (2005).
- 38) Xiao, Z., Storms, R., Tsang, A., A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Anal Biochem.*, **351**, 46-148 (2006).
- 39) Dahlqvist, A., Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.*, **7**, 18-25 (1964).
- 40) Nishiyama, I., Yamashita, Y., Yamanaka, M., Shimohashi, A., Fukuda, T., Oota, T., Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other actinidia species. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5472-5475 (2004).
- 41) Nuttall, FQ., Dietary fiber in the management of diabetes. *Diabetes*, **42**, 503-508 (1993).
- 42) Kyung-Ah, J., Tae-Chul, S., Daeseok, H., In-Ho, K. Young-Eon, K., Chang-Ho, L., Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts in vitro. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **28**, 1782-1785 (2005).
- 43) 深井洋一, 松沢恒友, 関谷敬三., モモ, リンゴ, プラム, ブドウ(巨峰), アNZ抽出物による糖・脂質代謝の活性化とインスリン感受性の上昇, 日本食品科学工学会誌(in Japanese), **47**, 92-96 (2000).

- 44) Oueslati, MH., Jannet, HB., Chriaa, ZMJ., Abreu, PM., Phytochemical constituents from *Salsola tetrandra*. *J. Nat. Prod.*, **69**, 1366-1369 (2006).
- 45) Tom, A., Philip S., Mary G., Mc M., David A., Streptozotocin diabetes. *J. Clin. Invest.*, **54**, 672-677(1974).
- 46) Makoto K., Yuko N., Investigation and Identification of antioxidative flavonols, quercetin and kaempferol glycosides in the unused parts of 10 types of food plants commonly consumed in japan. *Food Sci. Technol. Res.*, **5**, 125-128(1999).
- 47) Shirahata, T., Sunazuka, T., Yoshida, K., Yamamoto, D., Harigaya, Y., Kuwajima, I., Nagai, T., Kiyohara, H., Yamada, H., Ōmura, S., Total synthesis, elucidation of absolute stereochemistry, and adjuvant activity of trihydroxy fatty acids. *Tetrahedron.*, **62**, 9483-9496 (2006).

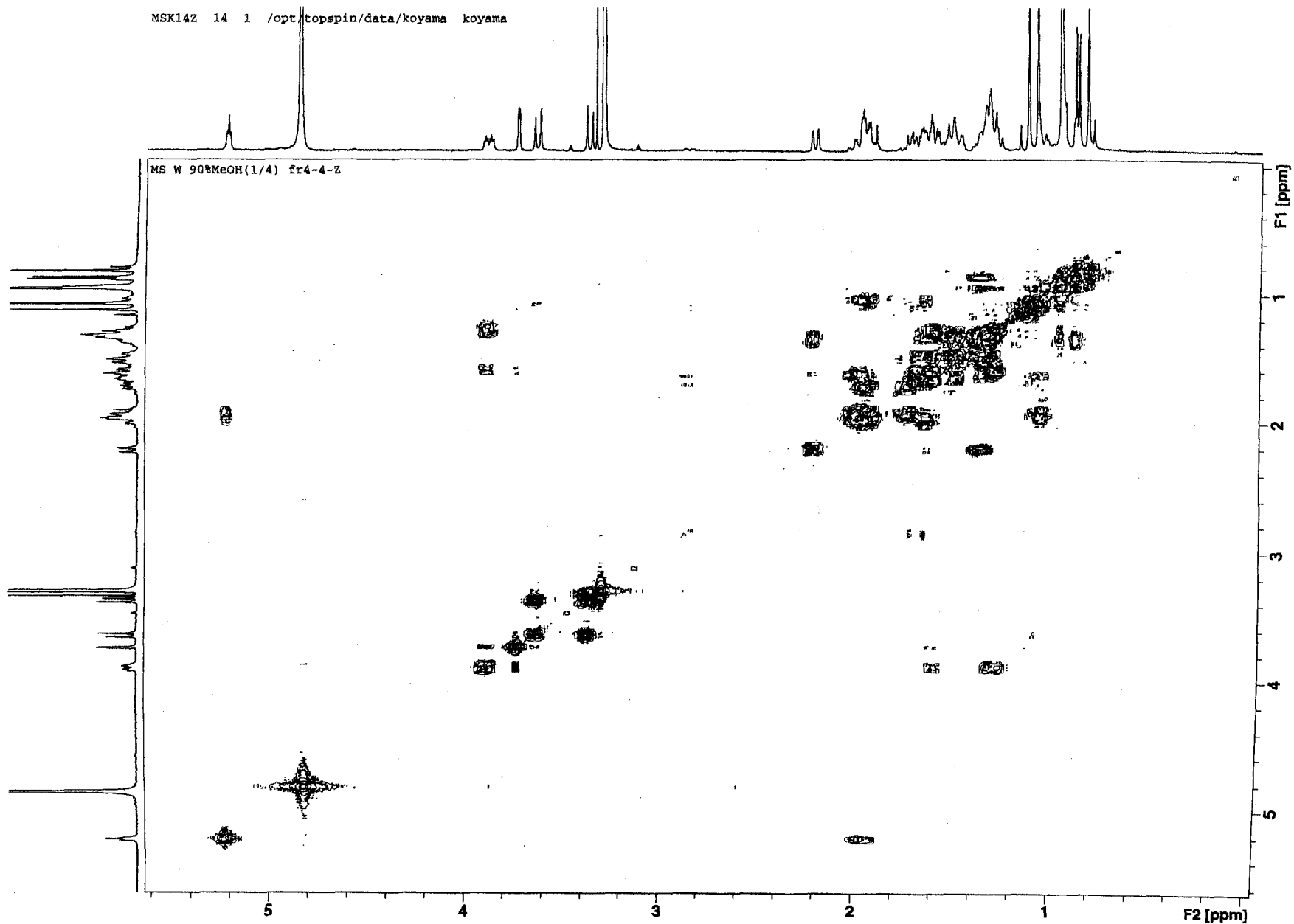


添付資料



1. キウイに含まれるα-アミラーゼ阻害活性成分の<sup>1</sup>H NMR スペクトル  
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

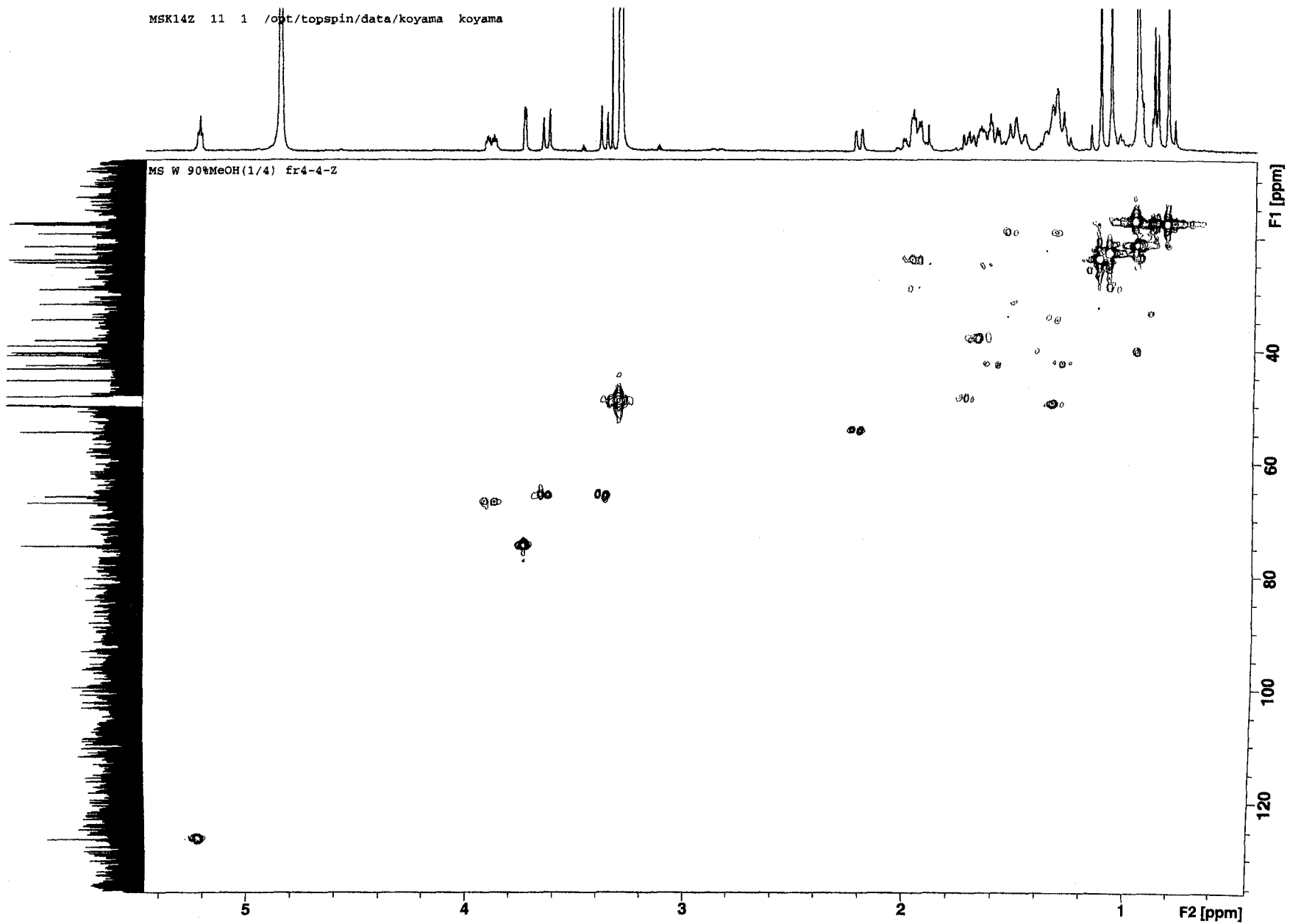
MSK14Z 14 1 /opt/topspin/data/koyama koyama



2. キウイに含まれる $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分の COSY スペクトル  
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

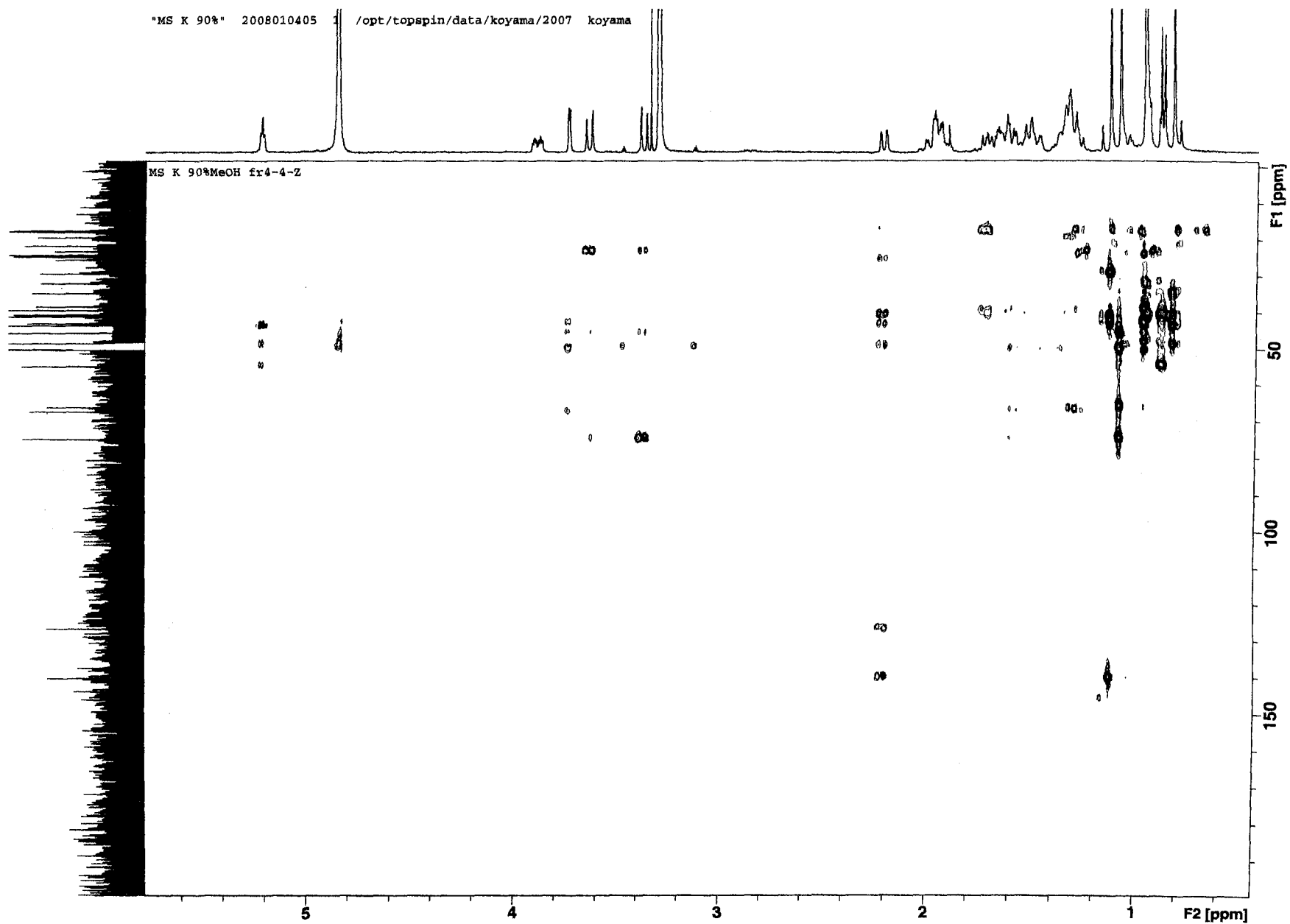
MSK14Z 11 1 /opt/topspin/data/koyama koyama

MS W 90%MeOH(1/4) fr4-4-Z

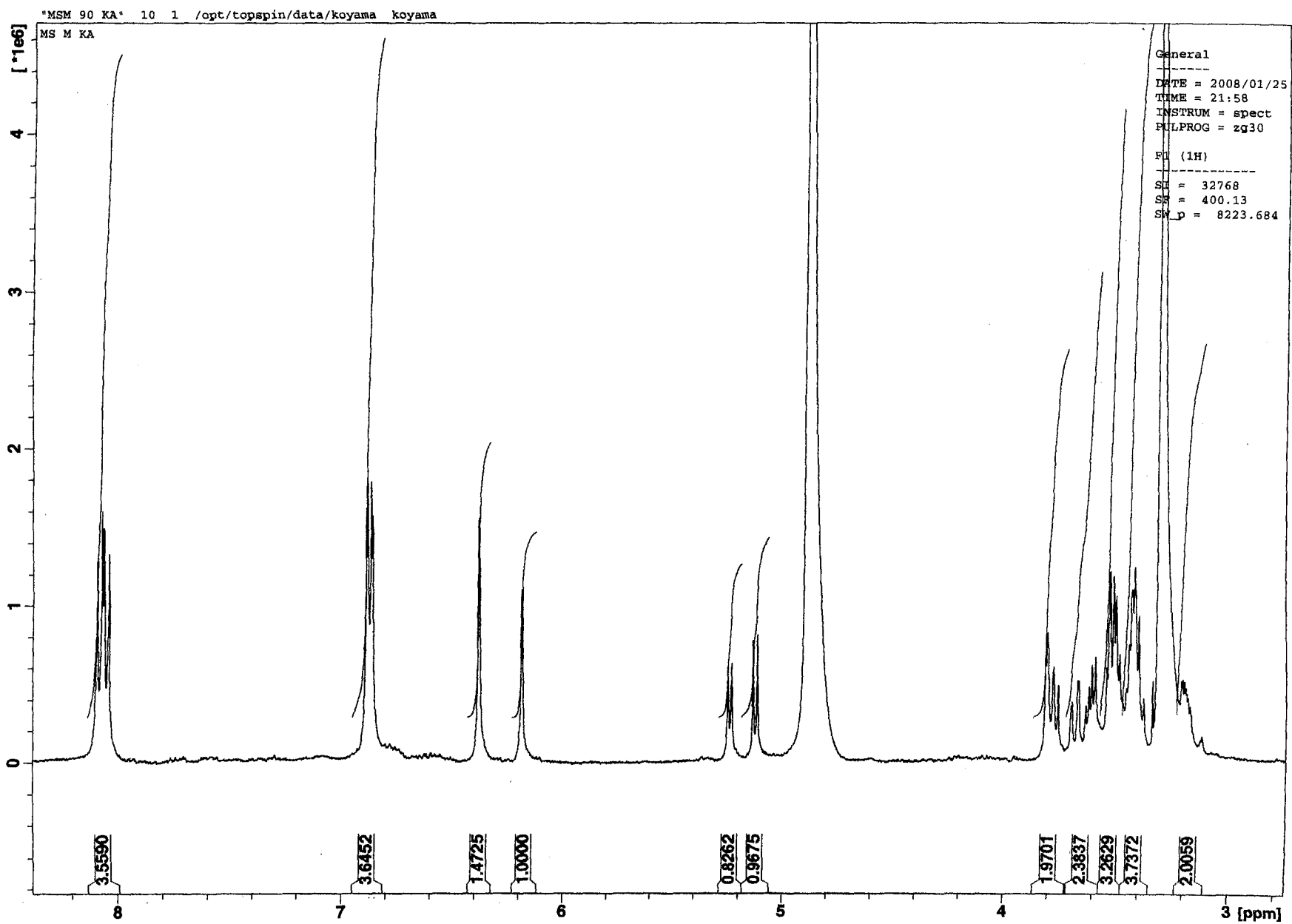


3. キクイに含まれる $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分のHMQCスペクトル  
(400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

4. キウイに含まれる $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分のHMBCスペクトル  
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

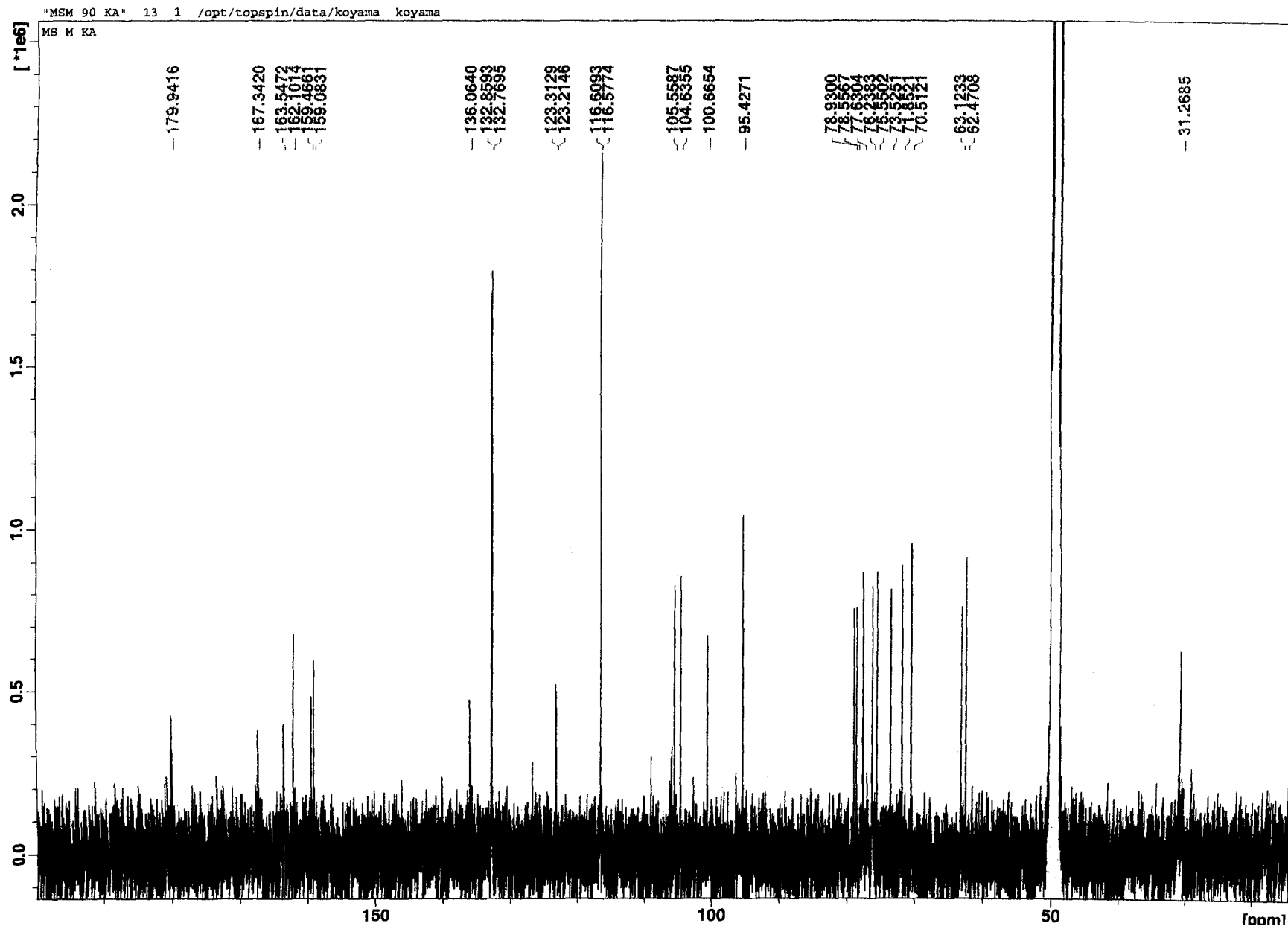


5. モモに含まれる $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分の $^1\text{H}$  NMR スペクトル  
(400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

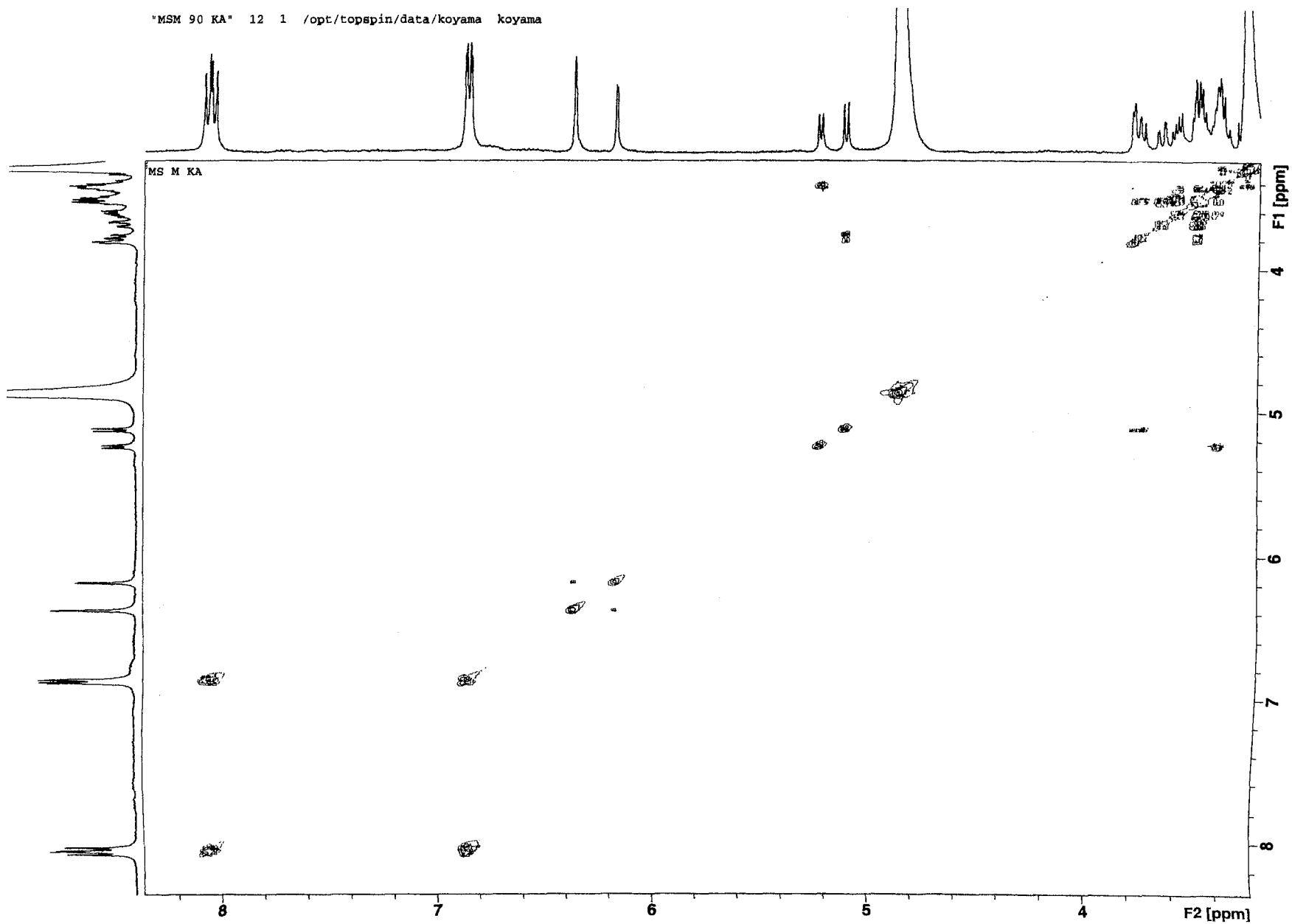




6. モモに含まれるα-アミラーゼ阻害活性成分の<sup>13</sup>C NMR スペクトル  
(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



"MSM 90 KA" 12 1 /opt/topspin/data/koyama koyama



7. モモに含まれる $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分の COSY スペクトル  
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

"MS071005 1 MS" 2 1 /opt/topspin odai

MS-momo 3 prespitare

General

DATE = 2007/10/05

TIME = 14:21

INSTRUM = spect

PULPROG = hsqcetgps12

F2 (1H)

SI = 1024

SF = 400.13

SW\_p = 5330.49

F1 (13C)

SI = 1024

SF = 100.613

SW\_p = 16666.667

F1 [ppm]

40

60

80

100

120

F2 [ppm]

8

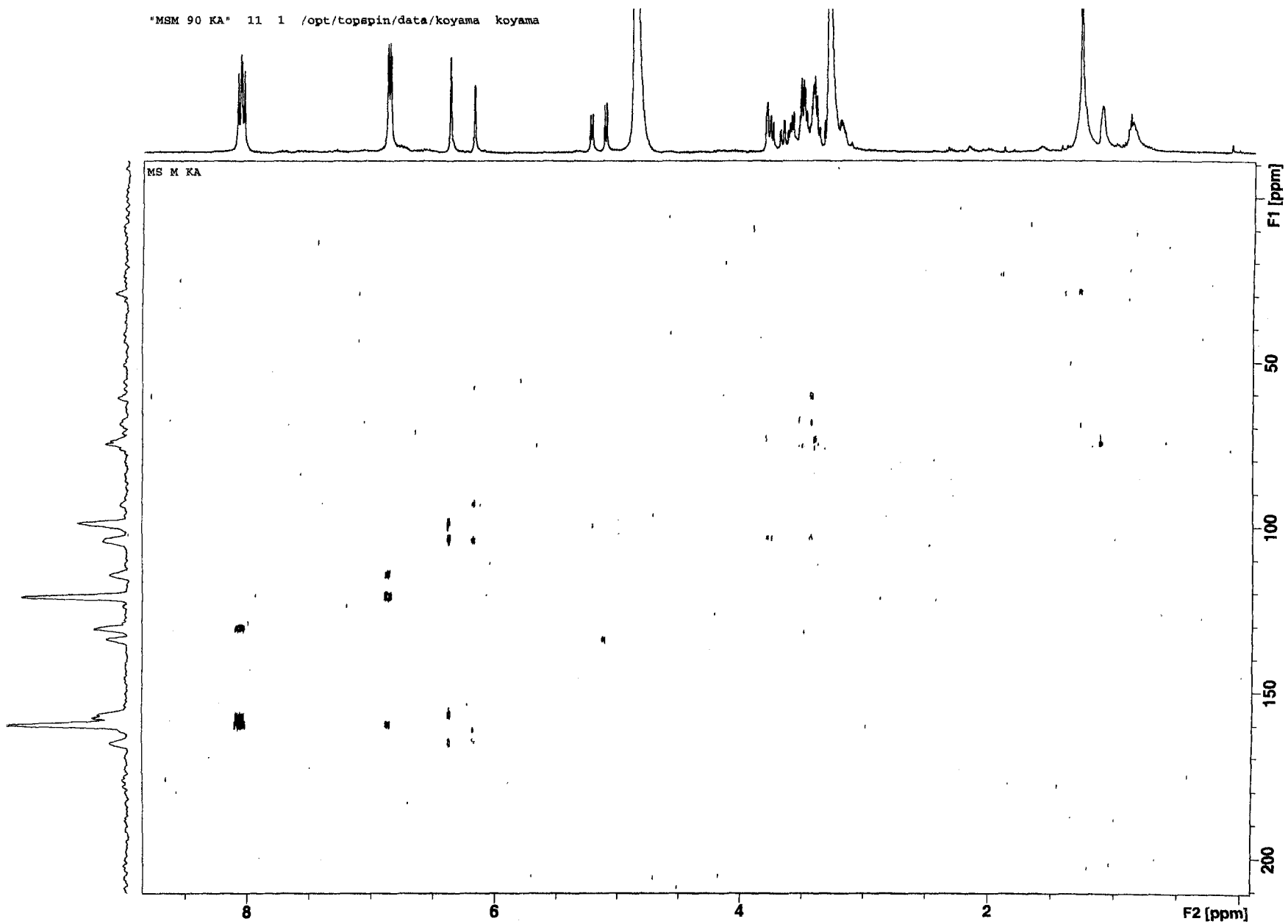
6

4

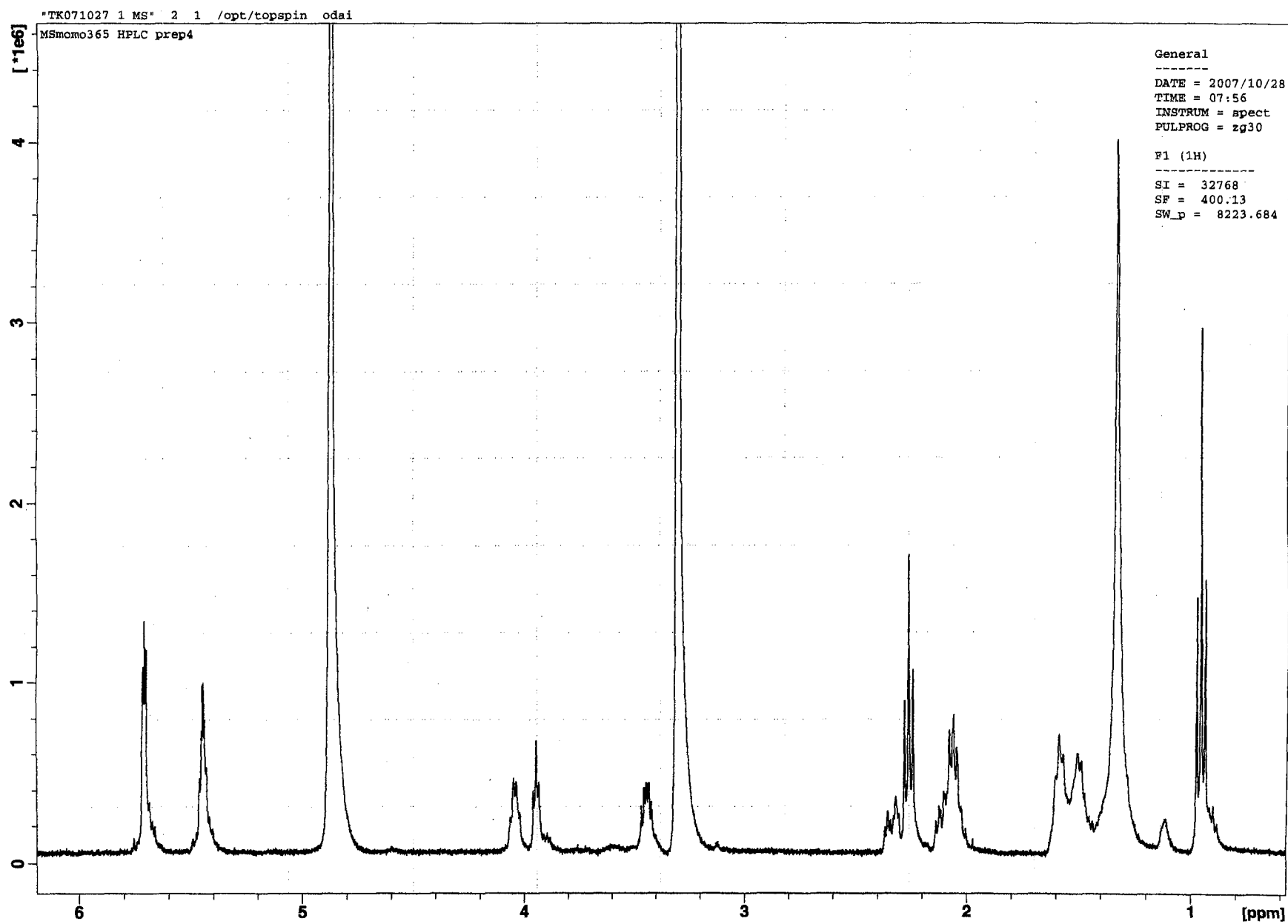
2

8. モモに含まれる $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分のHMQCスペクトル  
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

"MSM 90 KA" 11 1 /opt/topspin/data/koyama koyama

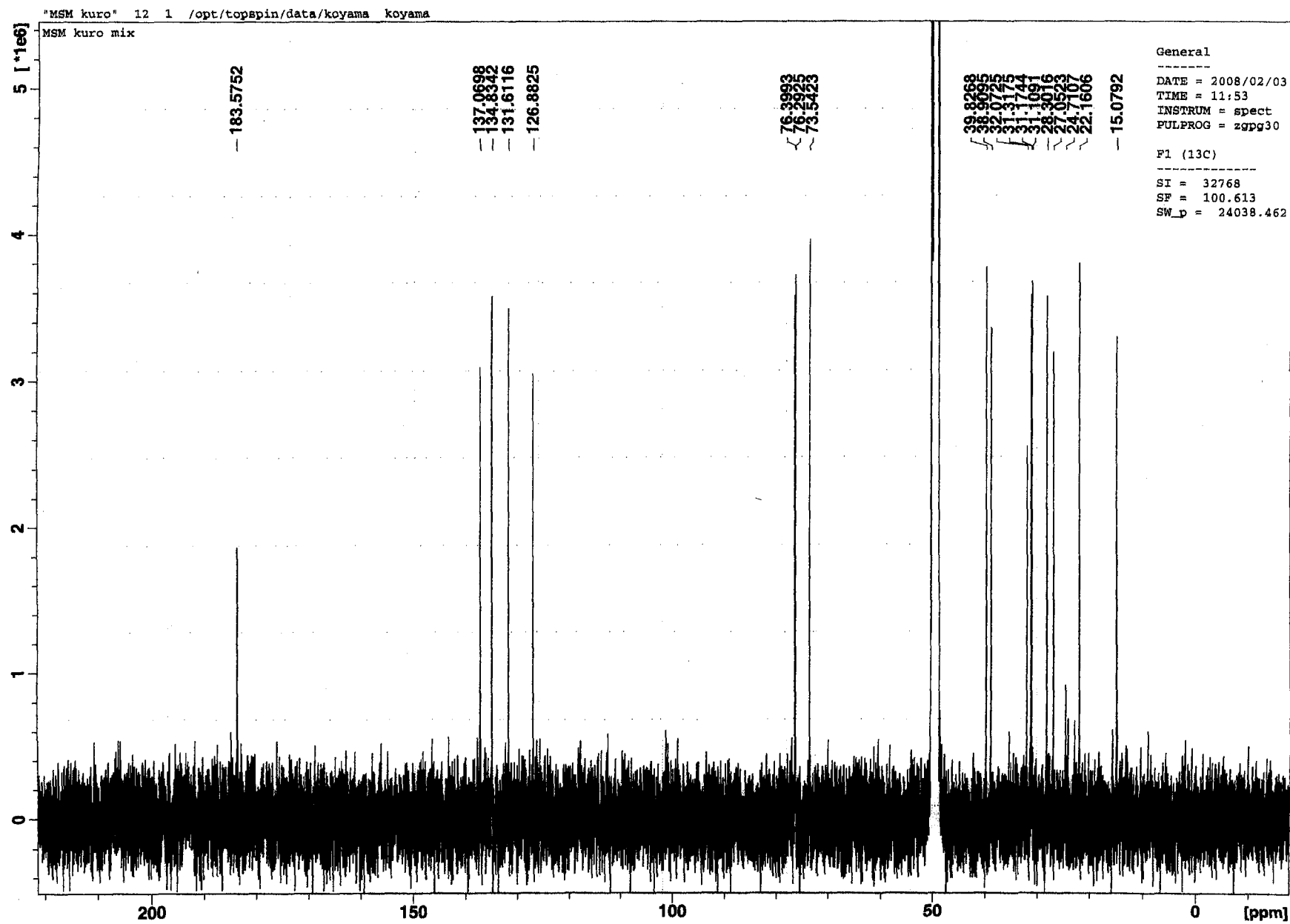


9. モモに含まれる $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性成分のHMBNMRスペクトル  
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



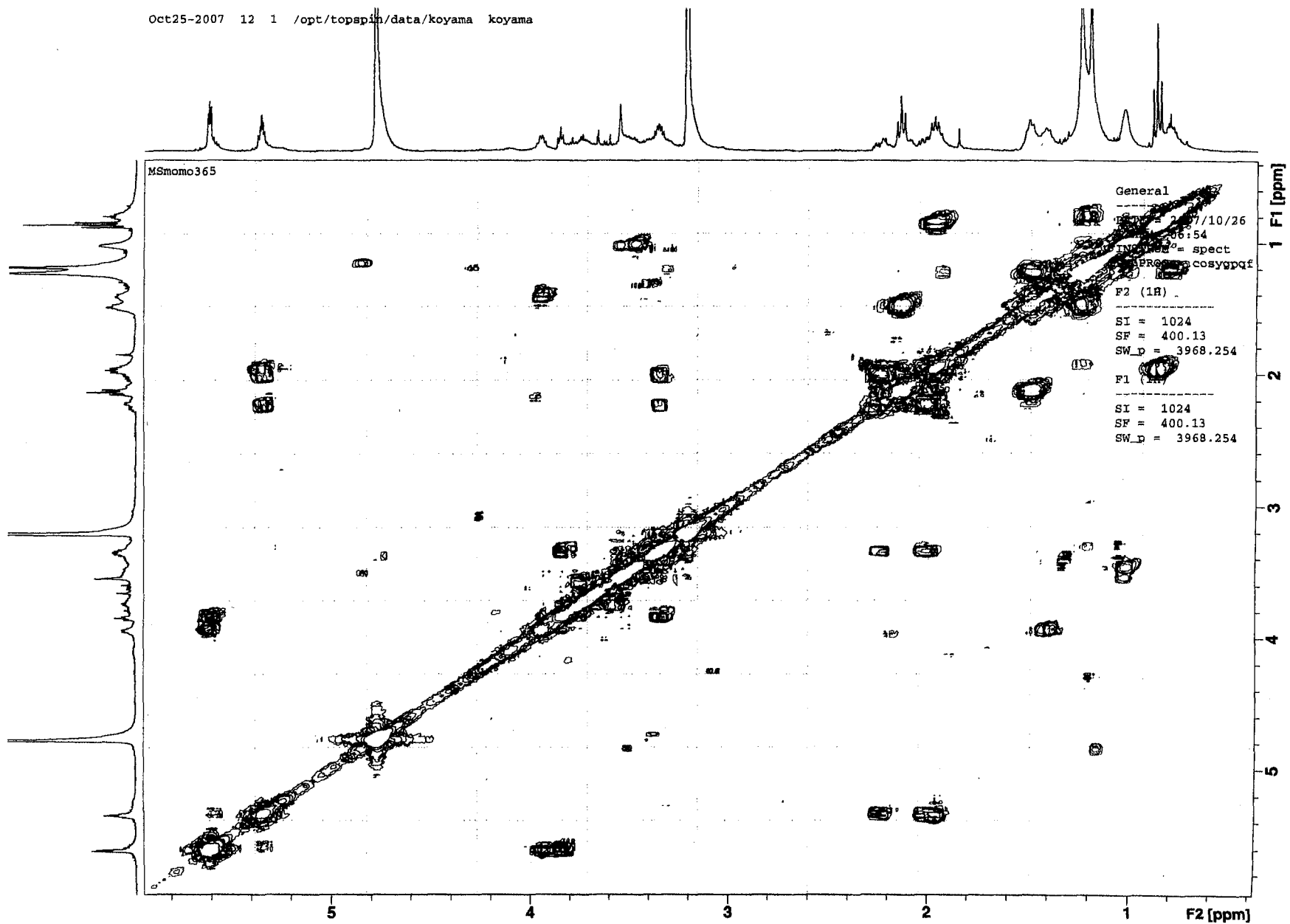
10. モモに含まれるグルコース吸収阻害活性成分の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル  
(400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

11. モモに含まれるグルコース吸収阻害活性成分の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル  
(100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )





Oct25-2007 12 1 /opt/topspin/data/koyama koyama



12. モモに含まれるグルコース吸収阻害活性成分の COSY スペクトル  
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

MSmomo365



Current Data Parameters  
NAME Oct25-2007  
EXPNO 11  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date 20071025  
Time 23.24

INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBO BB-  
PULPROG hmqcgpqf  
TD 1024  
SOLVENT MeOD  
NS 128  
DS 16  
SWH 3968.254 Hz  
FIDRES 3.875248 Hz  
AQ 0.1290740 sec  
RG 2050  
DW 126.000 usec  
DE 6.00 usec  
TE 295.2 K  
CNST2 145.0000000  
d0 0.00000300 sec  
d1 1.49754202 sec  
d2 0.00344828 sec  
d12 0.00002000 sec  
d13 0.00000400 sec  
d16 0.00020000 sec  
DELTA1 0.00222428 sec  
IN0 0.00003000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 9.00 usec  
P2 18.00 usec  
PL1 0.00 dB  
SFO1 400.1313675 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
CPDPRG2 garp  
NUC2 13C  
P3 9.70 usec  
PCPD2 65.00 usec  
PL2 3.00 dB  
PL12 19.52 dB  
SFO2 100.6203140 MHz

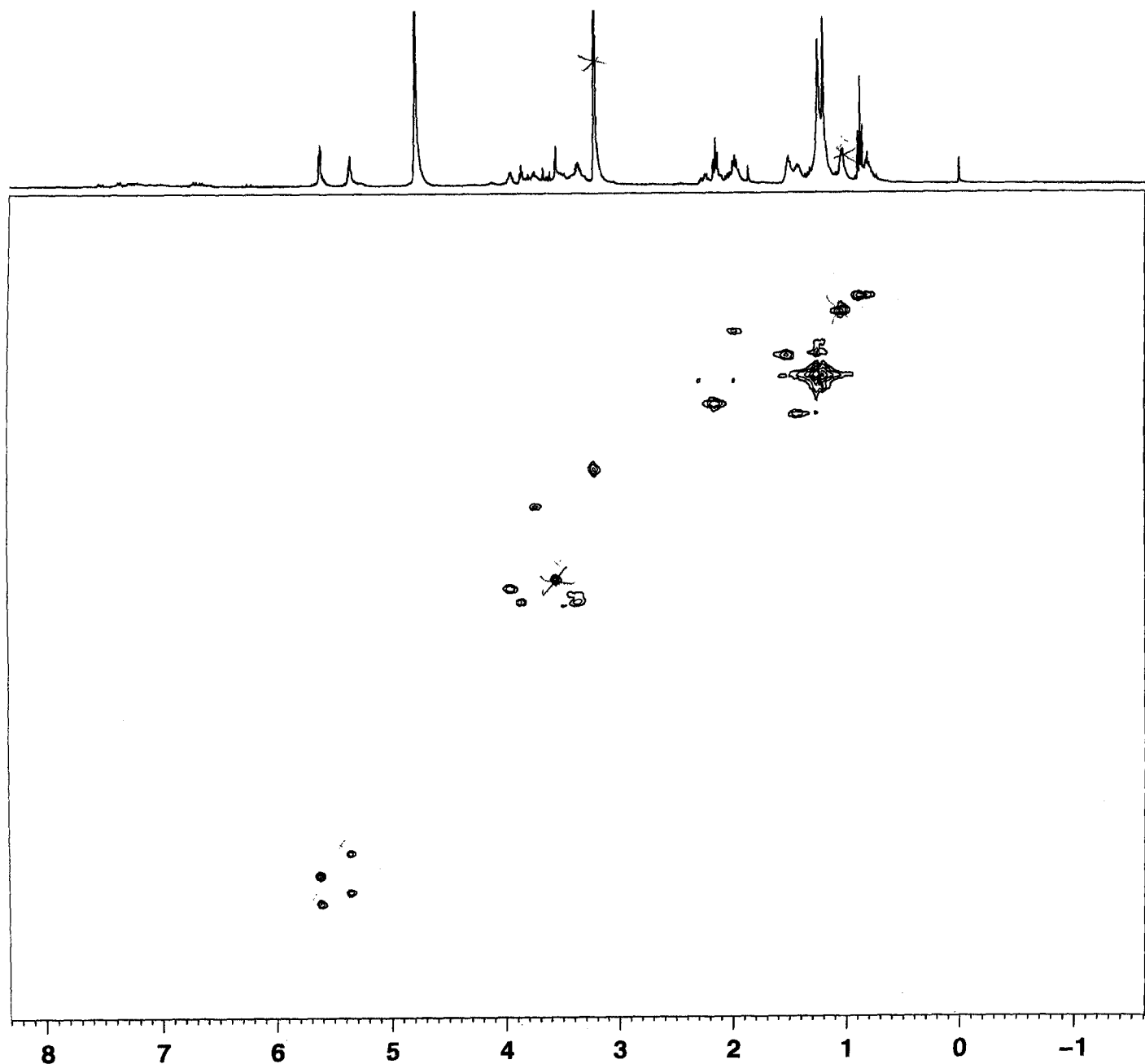
===== GRADIENT CHANNEL =====  
GPNAM1 SINE.100  
GPNAM2 SINE.100  
GPNAM3 SINE.100  
GPZ1 50.00 %  
GPZ2 30.00 %  
GPZ3 40.10 %  
P16 1000.00 usec

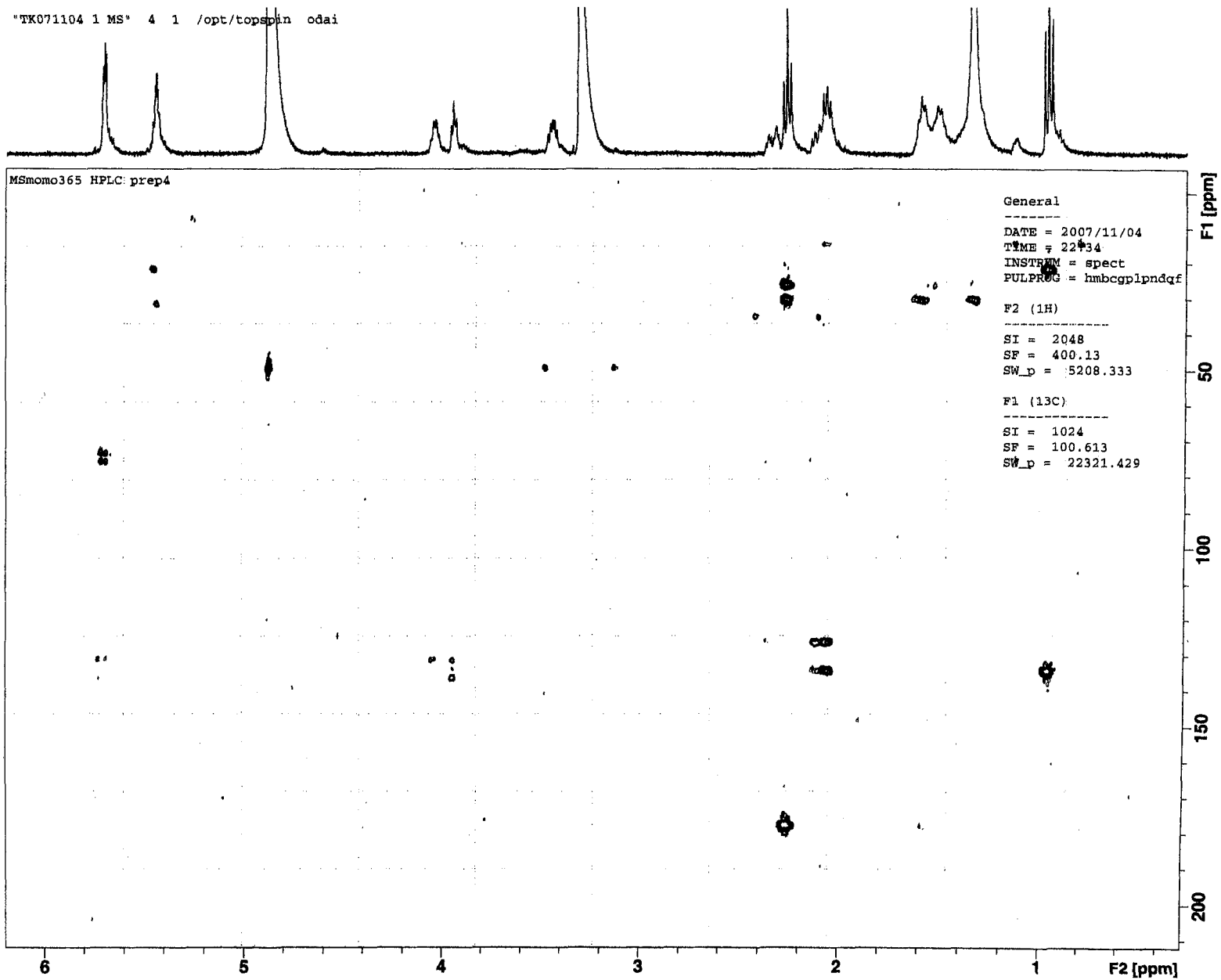
F1 - Acquisition parameters  
ND0 2  
TD 128  
SFO1 100.6203 MHz  
FIDRES 130.208328 Hz  
SW 165.639 ppm  
FMODE QF

F2 - Processing parameters  
SI 1024  
SF 400.1300477 MHz  
WDW QSINE  
SSB 2  
LB 0.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

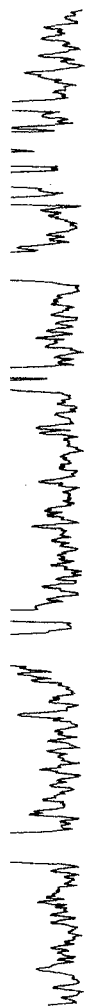
F1 - Processing parameters  
SI 1024  
MC2 QF  
SF 100.6127690 MHz  
WDW QSINE  
SSB 2  
LB 0.00 Hz  
GB 0

13. モモに含まれるグルコース吸収阻害活性成分の HMQC スペクトル  
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)





14. モモに含まれるグルコース吸収阻害活性成分の HMBC スペクトル  
(400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



MSM kuro mix



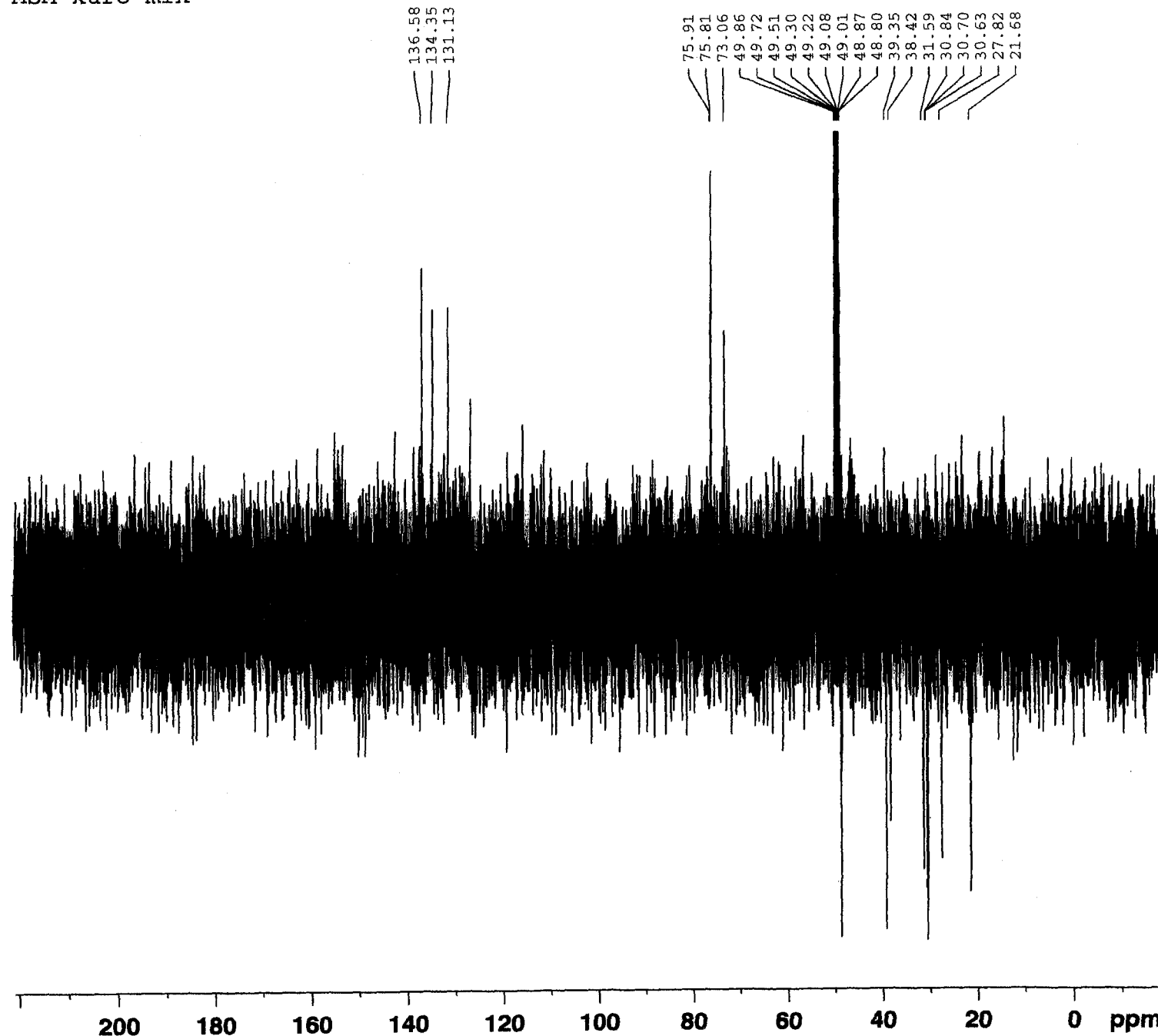
Current Data Parameters  
NAME MSM kuro  
EXPNO 11  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20080202  
Time 17.21  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBO BB-  
PULPROG dept135  
TD 65536  
SOLVENT MeOD  
NS 512  
DS 4  
SWH 24038.461 Hz  
FIDRES 0.366798 Hz  
AQ 1.3631988 sec  
RG 2050  
DW 20.800 usec  
DE 6.00 usec  
TE 300.0 K  
CNST2 145.0000000  
d1 2.00000000 sec  
d2 0.00344828 sec  
d12 0.00002000 sec  
DELTA 0.00001235 sec  
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 13C  
P1 9.70 usec  
P2 19.40 usec  
PL1 3.00 dB  
SFO1 100.6228298 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
CPDPRG2 waltz16  
NUC2 1H  
P3 10.00 usec  
P4 20.00 usec  
PCPD2 90.00 usec  
PL2 0.00 dB  
PL12 19.08 dB  
SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 100.6126261 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40



15. モモに含まれるグルコース吸収阻害活性成分の DEPT スペクトル  
(100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)